

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Farmacia

Departamento de Microbiología y Parasitología



TESIS DOCTORAL

Papel del estrés oxidativo en el mecanismo de acción de la anfotericina B y evaluación de la virulencia de hongos patógenos y de la eficacia de antifúngicos en *Galleria mellonella*

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ana Cecilia Mesa Arango

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA



**PAPEL DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN EL MECANISMO DE
ACCIÓN DE LA ANFOTERICINA B Y EVALUACIÓN DE LA VIRULENCIA
DE HONGOS PATÓGENOS Y DE LA EFICACIA DE ANTIFÚNGICOS EN**
Galleria mellonella

TESIS DOCTORAL

ANA CECILIA MESA ARANGO

Madrid, 2014

ÍNDICE

RESUMEN.....	ix
SUMMARY	xiii
 1. INTRODUCCIÓN.....	 3
1.1. Principales infecciones causadas por hongos patógenos	4
1.1.1. Infecciones causadas por levaduras.....	4
1.1.1.1. Candidiasis	4
1.1.1.2. Criptococosis.....	6
1.1.1.3. Otras levaduras	7
1.1.2. Infecciones por hongos filamentosos.....	7
1.1.2.1. Aspergilosis	8
1.1.2.2. Otros hongos filamentosos	9
1.1.2.3. Hongos endémicos.....	9
1.2. Estructuras básicas de los hongos.....	9
1.3. Interacción huésped-patógeno.....	10
1.4. Tratamiento de las infecciones fúngicas.....	13
1.4.1. Polienos	13
1.4.1.1. Mecanismo de acción de anfotericina B.....	14
1.4.1.1.1. Formación de canales en la membrana celular.....	15
1.4.1.1.2. Inducción de estrés oxidativo.....	15
1.4.2. Azoles	16
1.4.3. Equinocandinas.....	17
1.5. Mecanismos de resistencia a los antifúngicos.....	18
1.5.1. Resistencia a la anfotericina B	18
1.5.2. Resistencia a los azoles	19
1.5.3. Resistencia a equinocandinas	20
1.6. Correlación de la actividad antifúngica <i>in vitro</i> con la eficacia del tratamiento antifúngico en humanos.....	21
1.7. Modelos animales en el estudio de la infección fúngica: Modelos convencionales y no convencionales	22
 2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	 27
 3. MATERIAL Y MÉTODOS	 31
3.1. Cepas	31
3.1.1. Levaduras	31

3.1.2. <i>Aspergillus</i> spp.....	31
3.2. Técnicas microbiológicas.....	31
3.2.1. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.....	31
3.2.2. Ensayos de sensibilidad antifúngica <i>in vitro</i>	34
3.2.2.1. Microdilución en caldo.....	34
3.2.2.1.1. Antifúngicos.....	34
3.2.2.1.2. Determinación de la susceptibilidad antifúngica en levaduras.....	34
3.2.2.1.3. Determinación de susceptibilidad de <i>Aspergillus</i> spp.....	34
3.2.3. Curvas de crecimiento.....	35
3.2.4. Microscopía electrónica de transmisión.....	35
3.2.5. Detección de β -1,3-glucanos por inmunofluorescencia.....	36
3.3. Estrés oxidativo en respuesta al tratamiento con anfotericina B.....	37
3.3.1. Detección de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).....	37
3.3.2. Efecto de la anfotericina B sobre las proteínas.....	38
3.3.2.1. Extracción de proteínas.....	38
3.3.2.2. Derivación del grupo carbonilo y Western blot.....	38
3.3.2.2.1. Tratamiento de proteínas y separación.....	38
3.3.2.2.2. Detección de los grupos carbonilo por Western blot.....	39
3.3.3. Efecto de la rotenona sobre la producción de ROS en presencia de anfotericina B.....	40
3.3.3.1. Estandarización del efecto de la rotenona sobre la producción de ROS y la viabilidad de <i>C. tropicalis</i> tras el tratamiento con anfotericina B.....	40
3.3.3.2. Detección de la producción de ROS en presencia de rotenona y de anfotericina B.....	41
3.3.4. Evaluación del efecto del antioxidante L-cisteína sobre la producción de ROS y la viabilidad en presencia de anfotericina B.....	41
3.3.5. Determinación de la actividad catalasa.....	42
3.3.5.1. Obtención de extractos libres de células.....	42
3.3.5.2. Evaluación de la actividad enzimática.....	42
3.3.6. Evaluación del potencial de membrana mitocondrial.....	43
3.4. Mecanismos de resistencia a antifúngicos.....	43
3.4.1. Obtención de esteroides.....	43
3.4.2. Identificación de esteroides.....	44
3.4.3. Amplificación y secuenciación de los genes <i>ERG11</i> y <i>ERG3</i>	44
3.4.3.1. Iniciadores.....	44
3.4.3.2. Extracción de ADN.....	45
3.4.3.3. Condiciones de PCR y secuenciación.....	46
3.4.4. Análisis bioinformático de genes y proteínas.....	46
3.4.4.1. Genes descritos en este trabajo.....	46
3.4.4.2. Identificación de mutaciones en los genes <i>ERG11</i> y <i>ERG3</i> : Análisis de secuencias.....	47

3.4.5. Evaluación de la actividad de bombas de flujo	47
3.5. Estandarización de un modelo alternativo en <i>Galleria mellonella</i>	48
3.5.1. Infección y supervivencia de <i>Galleria mellonella</i>	48
3.5.2. Cuantificación de la producción de melanina como indicador de respuesta a la infección	49
3.5.3. Densidad hemocitaria	49
3.5.4. Fagocitosis <i>in vivo</i>	49
3.5.5. Morfología de levaduras <i>in vivo</i>	50
3.5.6. Estudio histológico de tejido larvario	50
3.5.7. Evaluación de la eficacia de antifúngicos en <i>G. mellonella</i>	51
3.5.7.1. Infección de <i>G. mellonella</i> con <i>C. tropicalis</i> y tratamiento antifúngico	51
3.5.7.2. Infección de <i>G. mellonella</i> con <i>Aspergillus</i> spp y tratamiento antifúngico	51
3.5.7.3. Determinación de la carga fúngica	52
3.6. Análisis estadístico	52
4. RESULTADOS	55
4.1. Mecanismo de acción de la anfotericina B	55
4.1.1. Evaluación del estrés oxidativo inducido por anfotericina B en diferentes especies de levadura	55
4.1.2. Efecto de la anfotericina B sobre las proteínas	56
4.1.3. Efecto de la L-cisteína sobre la producción de ROS y de la viabilidad de <i>C. tropicalis</i> en presencia de anfotericina B	58
4.1.4. Efecto de la rotenona sobre la actividad antifúngica de anfotericina B	58
4.2. Relación entre estrés oxidativo y resistencia a anfotericina B	62
4.2.1. Estrés oxidativo y resistencia adquirida a anfotericina B	62
4.2.1.1. Determinación de la producción de ROS en cepas sensibles y resistentes a anfotericina B	62
4.2.1.2. Efecto de las ROS sobre las proteínas celulares	66
4.2.1.3. Evaluación de la actividad catalasa	67
4.2.2. Estrés oxidativo y resistencia intrínseca o primaria a anfotericina B	68
4.3. Caracterización fenotípica de cepas de <i>C. tropicalis</i> sensibles y resistentes a anfotericina B	69
4.3.1. Morfología y función mitocondrial	69
4.3.1.1. Crecimiento en fuentes de carbono fermentables y respiratorias	71
4.3.1.2. Evaluación del potencial de membrana mitocondrial	71
4.3.1.3. Estudio de la estructura mitocondrial	73
4.3.2. Otras características celulares	73
4.3.2.1. Tamaño de las levaduras y ancho de la pared	73
4.3.2.2. Detección de β -1,3-glucanos	76
4.3.2.3. Crecimiento en rojo Congo	76

4.4. Relación entre ergosterol y resistencia a anfotericina B.....	78
4.5. Resistencia cruzada entre azoles y anfotericina B.....	81
4.5.1. Amplificación y secuenciación de los genes <i>ERG11</i> y <i>ERG3</i>	81
4.5.2. Análisis de la secuencia del gen <i>ERG11</i>	81
4.5.3. Análisis de la secuencia del gen <i>ERG3</i>	84
4.5.4. Evaluación de la activación de bombas de flujo en <i>C. tropicalis</i>	84
4.6. Evaluación de la virulencia y respuesta antifúngica en el modelo alternativo: <i>Galleria mellonella</i>	86
4.6.1. Evaluación de la virulencia de <i>C. tropicalis</i> en <i>G. mellonella</i>	86
4.6.1.1.1. Melanización de las larvas de <i>G. mellonella</i> tras la infección con <i>C. tropicalis</i>	89
4.6.1.1.2. Densidad hemocitaria en respuesta a la infección.....	91
4.6.1.1.3. Capacidad de filamentación de <i>C. tropicalis</i>	91
4.6.1.2. Eficacia del tratamiento con antifúngicos durante la infección de <i>G. mellonella</i> con <i>C. tropicalis</i>	93
4.6.1.2.1. Supervivencia de <i>G. mellonella</i> infectadas con <i>C. tropicalis</i> y tratadas con diferentes antifúngicos.....	93
4.6.1.2.2. Evaluación de la carga fúngica en <i>G. mellonella</i> tras el tratamiento con anfotericina B y fluconazol.....	96
4.6.1.2.3. Estudio histopatológico del tejido de <i>G. mellonella</i> infectada con <i>C. tropicalis</i>	96
4.6.2. <i>Galleria mellonella</i> como huésped para evaluar virulencia de <i>Aspergillus</i> spp y eficacia antifúngica.....	97
4.6.2.1. Virulencia.....	97
4.6.2.2. Eficacia del tratamiento con anfotericina B y voriconazol en la infección de <i>G. mellonella</i> con <i>Aspergillus</i> spp.....	98
5. DISCUSIÓN	103
5.1. Importancia del estrés oxidativo en el mecanismo de acción de la anfotericina B.....	104
5.2. Mecanismo de resistencia a azoles y resistencia cruzada con anfotericina B.....	110
5.3. <i>Galleria mellonella</i> : un modelo alternativo para el estudio de virulencia fúngica y eficacia de antifúngicos.....	116
5.3.1. Virulencia de <i>Candida tropicalis</i> y <i>Aspergillus</i> spp en <i>Galleria mellonella</i>	117
5.4. Eficacia de antifúngicos en larvas de <i>G. mellonella</i> infectadas con <i>C. tropicalis</i> y <i>Aspergillus</i> spp.....	120
6. CONCLUSIONES.....	125
7. REFERENCIAS.....	129
8. ANEXOS	153
8.1. Secuencias de los genes <i>ERG3</i> y <i>ERG11</i>	153

8.2. Comunicaciones a congresos	169
8.3. Publicaciones.....	171

Abreviaturas

A

ADN	Ácido desoxirribunucleico
AFST-	Antifungal Susceptibility Testing
EUCAST	Subcommittee European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing.
AmB	Anfotericina B
ANF	Anidulafungina
APD	Agar Patata Dextrosa
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo (<i>American Type Culture Collection</i>)

C

CAS	Caspogungina
CBS	Central Bureau voor Schimmelcultures
CLZ	Clotrimazol
CM	Colección de Micología
CMI	Concentración mínima inhibitoria

D

DE	Desviación estándar
DHF	Diacetato de dihidrofluoresceína
DMLs	Inhibidores de la 14 α demetilasa
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNTP	2,4 dinitrofenilhidrazina
DO	Densidad óptica

E

EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
------	---------------------------------

G

G	Gramo
G	Gravedades
GC-MS	Cromatografía de gases- Espectrometría de Masas (<i>Gas chromatography-mass spectrometry</i>)

H

HAART	Terapia antirretroviral de alta actividad (<i>Highly Active Antiretroviral Therapy</i>)
h	Horas

I

IMF	Intensidad media de fluorescencia
IPS	Salino fisiológico para insectos (<i>Insect Physiological Saline</i>)
ITS	Secuencias espaciadoras internas (<i>Internal transcribed spacer</i>)
ITZ	Itraconazol

K

Kb	Kilobase
Kg	Kilogramo
KCZ	Ketoconazol

M

M	Molar
®	Marca registrada
MD	Media
MES	Ácido 2-morfolino etano sulfónico
MET	Microscopio Electrónico de Transmisión
MG	Media geométrica
mg	Miligramo
MCF	Micafungina
μ g	Microgramos
μ L	Microlitro
min	Minutos
mL	Mililitro
MM	Medio mínimo
mM	Milimolar
MOPS	Ácido 3-(N- morfolino)propanosulfónico

N

NADPH	Dinucleótido fosfato hidrógeno
-------	--------------------------------

P

PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida (<i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
PBS	Tampón fosfato salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCZ	Posaconazol
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
$\Delta\psi$ m	Potencial de membrana mitocondrial

R

ROS	Especies reactivas de oxígeno (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
rpm	Revoluciones por minuto

S

s	Segundos
SDS	Dodecil sulfato sódico
SFB	Suero fetal bovino
SOD	Superoxido dismutasa

T

TFA	Ácido trifluoroacéticos
-----	-------------------------

U

UA	Unidades arbitrarias
UFCs	Unidades formadoras de colonias

V

VCZ	Voriconazol
VIH	Marca registrada

Y

YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i>
YPD	<i>Yeast Peptone Dextrose</i>

RESUMEN

La incidencia de las infecciones fúngicas ha aumentado en los últimos años como consecuencia del incremento en el número de pacientes inmunosuprimidos. Aunque especies de los géneros *Candida*, *Aspergillus* y *Cryptococcus* son las más frecuentes, es notoria la emergencia de nuevas especies con baja sensibilidad o resistencia a los principales antifúngicos. El tratamiento de las infecciones fúngicas se basa principalmente en fármacos de la familia de los polienos (anfotericina B) de los azoles (fluconazol, voriconazol, itraconazol y posaconazol) y de las equinocandinas (caspofungina, anidulafungina y micafungina). A pesar de ello, el número de antifúngicos es limitado para afrontar el reto terapéutico que imponen estas infecciones. Lo anterior indica que existe una necesidad de desarrollar nuevas moléculas, o bien, modificar las ya existentes. El último caso, implica el conocimiento de mecanismos de acción y de resistencia de los fármacos en uso. Además es importante disponer de un modelo animal para evaluar la correlación de la susceptibilidad *in vitro* con la eficacia *in vivo*.

La anfotericina B es un antifúngico con amplio espectro de acción y uno de los más utilizados en la clínica y a pesar de llevar más de 50 años en el mercado, no se conoce con precisión su mecanismo de acción. Inicialmente, el efecto fungicida se atribuyó a la capacidad para formar poros en la membrana tras la unión al ergosterol. Sin embargo también se ha sugerido la participación de otros mecanismos como dependiente de la simple unión de la anfotericina B al ergosterol o la inducción de estrés oxidativo. La importancia del último mecanismo en la acción fungicida de la anfotericina B ha sido poco estudiada.

En la primera parte de este trabajo se analizó la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y su papel en la actividad de la anfotericina B en diferentes levaduras de importancia clínica. Los resultados mostraron que la anfotericina B induce la producción de ROS en todas las especies ensayadas. Además, en *Cryptococcus neoformans* y *Candida tropicalis* se comprobó que la anfotericina B indujo carbonilación de proteínas, como producto de la acumulación de ROS a nivel intracelular. Además, el tratamiento de las levaduras con el antioxidante L-cisteína previo a la adición de la anfotericina B, redujo la detección de ROS y protegió las levaduras del efecto fungicida del antifúngico. Las ROS se producen principalmente en la cadena transportadora de electrones, a nivel mitocondrial, por lo que se decidió evaluar el efecto del bloque del complejo I de esta cadena con rotenona. Los resultados mostraron que la detección de ROS en las levaduras en presencia de rotenona y anfotericina, no producían ROS y además eran viables, contrastando con lo observado en las levaduras tratadas solo con

anfotericina. Adicionalmente, se investigó la producción de ROS en cepas de *Candida tropicalis* y *Aspergillus* spp sensibles y resistentes a la anfotericina. La acumulación de ROS fue significativamente menor en las cepas resistentes en comparación con las sensibles. Para profundizar en los procesos de resistencia a anfotericina B, nos centramos principalmente en cepas de *C. tropicalis*. En este caso, la resistencia a anfotericina B estuvo asociada a un incremento de la actividad catalasa, ausencia de carbonilación proteica, alteración en el potencial de membrana mitocondrial y limitación en el crecimiento en medios no fermentables. Además, se observaron cambios en el grosor de la pared celular, en el contenido de β -1,3-glucanos y en la resistencia al rojo Congo que diferenciaron cepas sensibles y resistentes. Los resultados de esta primera parte permitieron concluir que el estrés oxidativo es importante en el mecanismo de acción de la anfotericina B y que alteraciones celulares que lleven a la disminución en la producción de ROS y/o la activación de mecanismos antioxidantes están relacionadas con la resistencia a este antifúngico. Además se encontró resistencia cruzada entre AmB y azoles como resultado de mutaciones en dos enzimas clave en la vía de síntesis del ergosterol: Erg3p y Erg11p. Estas mutaciones son responsables de la ausencia de ergosterol en la membrana celular y de un incremento en esteroides 14- α -metilados.

Aparte de la comprensión de los mecanismos de acción de los antifúngicos *in vitro*, es importante también evaluar como se comportan estos fármacos *in vivo*. Aunque los modelos mamíferos continúan siendo la referencia en estos estudios, limitaciones como el coste y los problemas bioéticos asociados al uso de estos modelos, han llevado a la búsqueda de huéspedes alternativos. Entre los modelos disponibles se encuentra el lepidóptero *Galleria mellonella*. Así, en la segunda parte del trabajo, nos centramos en evaluar la utilidad de este insecto con dos objetivos: i) estudiar la virulencia de hongos con diferente capacidad patogénica, y ii) evaluar la correlación entre la sensibilidad de estos hongos *in vitro* con la eficacia *in vivo* de antifúngicos de uso clínico. En primer lugar se estandarizó el modelo para estudiar la virulencia de cepas de *C. tropicalis*, *Aspergillus fumigatus* y *A. lentulus*, y encontramos que *G. mellonella* es susceptible a la infección por estas especies fúngicas. Además, observamos que es posible utilizar *G. mellonella* para distinguir entre cepas con diferente nivel virulencia. A continuación, utilizando cepas sensibles y resistentes a distintos antifúngicos, se evaluó la eficacia de antifúngicos durante la infección de *C. tropicalis* y *Aspergillus* spp en *Galleria mellonella*. El modelo se estandarizó con fármacos pertenecientes a todas las familias de antifúngicos utilizados en clínica: anfotericina B, fluconazol, voriconazol y anidulafungina, como representante de las equinocandinas. Los resultados obtenidos mostraron una correlación entre la eficacia

de todos los antifúngicos *in vivo* y el perfil de sensibilidad/resistencia de las distintas cepas a todos los antifúngicos *in vitro*.

En conclusión, *G. mellonella* es un modelo de huésped alternativo válido para la investigación de la virulencia de hongos con diferente capacidad patogénica así como para evaluar la eficacia de antifúngicos *in vivo* durante la infección con cepas fúngicas con diferente sensibilidad *in vitro*. Por último, nuestros resultados confirman que *G. mellonella* ofrece una herramienta útil para mejorar y depurar el diseño de experimentos a realizar en mamíferos, lo que contribuye de manera significativa a reducir el impacto ético de la investigación en micología clínica.

SUMMARY

Title: Role of oxidative stress in the mechanism of action of amphotericin B, evaluation of virulence of pathogenic fungi, and antifungal efficacy in *Galleria mellonella*.

1. Introduction: The incidence of opportunistic fungal infections has increased significantly in recent decades, and nowadays, it represents a significant human health problem. This rise has mainly been caused by an increase in immunocompromised patients, but there are also other factors that contribute to the occurrence of new cases of fungal infections, such as the use of broad-spectrum antibiotics, prolonged hospitalization, parenteral nutrition, advanced age, and diabetes. Among fungal pathogens, the species of *Candida*, *Aspergillus* and *Cryptococcus* are the most frequent in human infections, but other emerging fungi are increasing and some of them are resistant or have low sensitivity to antifungal activity.

Most invasive and disseminated infections are caused by *Candida* species (70-90%), and mortality can be very high, as is the case of candidaemia (around 40-50%) depending on patient condition and the species involved. *Candida albicans* is the most virulent species and the most frequently isolated. It is also the most important within the genus in terms of clinic issues. On the other hand, non-*albicans* species are normally more resistant to antifungal agents than *C. albicans*, and in recent years, their incidence has significantly increased, in such a way that they now account for approximately 50% of all episodes of candidaemia. These species are mainly *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* and *C. krusei*. *Candida* species and antifungal susceptibility vary according to geographical region. Other clinically important agents are *Cryptococcus* spp. *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* are the most noteworthy species. The former mainly affects immunocompromised, the latter affects healthy persons.

The incidence of infections caused by filamentous fungi is lower than that of those caused by yeast infection, but mortality is higher. The most important genus in this fungal group is *Aspergillus*, with *A. fumigatus* being the most relevant from a clinical point of view; other species, such as *A. terreus*, *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. lentulus* and *A. niger*, have shown an increased incidence among susceptible patients.

Currently, the treatment of invasive fungal infections is based on the use of three families of antifungals: polyenes (amphotericin B), azoles (fluconazole, voriconazole, itraconazole and posaconazole) and echinocandins (caspofungin, anidulafungina and micafungin). Amphotericin B has a strong fungicidal effect and is one of the most widely used antifungals in clinical practice. Although this molecule presents multiple deleterious

effects on fungal cells, its specific mechanism of action still remains unknown. The classical action mechanism involves the amphotericin B binding to membrane ergosterol. It then results in the pore formation and ion leakage. However, different findings suggest that this might not be the main mode of action, and that this molecule can act through ergosterol sequestration rather than by triggering alterations in selective membrane permeability and pore formation. In addition, amphotericin B induces the production of reactive oxygen species (ROS), but the importance of this mechanism in the fungicidal action of amphotericin B is not well known. Secondary resistance to this antifungal is rare; however, intrinsic or primary resistance, mainly present in filamentous fungi, is not uncommon.

Contrary to amphotericin B, the mechanisms of action and resistance of both azoles and echinocandins have been identified. Azoles inhibit ergosterol synthesis by binding to the sterol 14- α -demethylase enzyme (encoded by the *ERG11* gene). Resistance to this antifungal group can be the result of activation of efflux pumps, amino acids changes on the azole target, or increased expression of the enzyme. Echinocandins inhibit β -1,3-glucan synthase, altering wall synthesis, and resistance is determined by mutations in this enzyme.

The number of available antifungal agents required to meet the challenge of fungal infections is small, so it is necessary to develop new molecules, even though such development is a long and expensive process. An alternative to the new drugs development is to study molecules that are derived from the ones already available to obtain more effective molecules and least toxic. This demand having adequate knowledge about both the specific drug mechanism of action of the original molecules and the knowledge of the resistance mechanisms that the fungi use to avoid them. Also, is very important to have an animal model available to test whether there is correlation of *in vitro* susceptibility to *in vivo* efficacy. Traditionally, rodents have been useful for the study of infectious diseases and of the efficacy and toxicity of drugs because they share similarities with humans, although nowadays, there are some limitations to using them, such as bioethical and economic issues. Therefore, there is growing interest among the scientific community to develop alternative models that can alleviate, at least in part, the limitations to the use of vertebrate animals in experimentation. In this regard, simple organisms, like insects, are being implemented as models of fungal infection with encouraging results. Among them, *Galleria mellonella*, the greater wax moth, is one of models increasingly used.

With this background in mind, in this work we intend to research in both lines: to understand the relationship between oxidative stress and the antifungal activity of AmB, and to evaluate the usefulness of *G. mellonella* as a model to study fungal virulence and *in vivo* - *in vitro* correlation.

Objectives: i) To evaluate the role of oxidative stress in the mode of action of the amphotericin B, ii) To study the mechanism of cross-resistance between azoles and amphotericin B, and iii) To standardize an alternative model of fungal infection in *Galleria mellonella* to study fungal virulence and antifungal drug efficacy.

Results: In the first stage of this work, the production of ROS in the presence of amphotericin B in fungi, which show different *in vitro* susceptibility profiles, was analyzed. For this purpose, *Candida* and *Aspergillus* species were included. Amphotericin B induced ROS production in all the fungal species tested. Moreover, using *C. tropicalis*, we evaluated some factors that are related to the response to oxidative stress, such as protein carbonylation as an indication of oxidative damage. We also observed that the addition of L-cysteine (an antioxidant) reduced the production of ROS and protects cells from antifungal activity of amphotericin B. Since ROS are mainly produced as subproducts of the respiratory chain, we looked into the effect of mitochondrial complex inhibitors. Rotenone, which acts on mitochondrial complex I, inhibiting ROS production in the presence of amphotericin B, and consequently, counteracting its antifungal effect. Then, we analyzed the production of ROS in amphotericin B resistant isolates with the conclusion that in these resistant strains there was no significant accumulation of ROS upon the addition of amphotericin B. To delve into the processes of resistance to amphotericin B, we mainly focused on *C. tropicalis* strains. In this case, the resistance to amphotericin B was associated to an increase in catalase activity, an absence of protein carbonylation, an alteration of the mitochondrial membrane potential, together with a growth limitation on non-fermentable media. Besides, changes in cell wall, which differentiated susceptible strains from resistant strains, were observed, such as an increase in cell wall thickening, stronger detection of β -1,3-glucans and in the resistance to Congo red. Some of the tested *C. tropicalis* isolates showed cross resistance to azoles and amphotericin B, which led us to look into the cause for this phenomenon. This cross resistance is associated to mutations in Erg3p and Erg11p; the consequences of these mutations were the absence of ergosterol and the accumulation of 14- α -methylated sterols, which offset the lack of ergosterol and protect the yeast from the antifungal effect of amphotericin B. Besides, the mutation found at the azole target (Erg11p) conferred the resistance to azole drugs.

Since the activation of efflux pumps is an important mechanism in azole resistance in *Candida* spp, we also evaluated this mechanism in *C. tropicalis* but we did not find any activation of these efflux pumps.

As it was observed in *C. tropicalis*, we also found association between low detection of ROS in *A. lentulus* (as a model of intrinsic amphotericin B resistance) and in *A. terreus* (as a model of primary amphotericin B resistance), contrasting with the results of *A. fumigatus*. Unlike what was observed with *C. tropicalis*, no difference in the amount of ergosterol was observed between the strains of *Aspergillus* that are susceptible and resistant to amphotericin B, concluding that different resistance mechanism are operating between the different models of resistance.

In the second part of the work, we focused on evaluating the usefulness of the *G. mellonella* model as an alternative model of fungal infection with two aims: i) to study the virulence of fungi with different pathogenic capabilities, and ii) to evaluate the correlation between the *in vitro* susceptibility of these fungi and the *in vivo* efficacy of clinically used antifungals. First, we standardized the model to study the virulence of strains of *C. tropicalis*, *Aspergillus fumigatus* and *A. lentulus*. Optimal inoculum size, incubation temperature and time of infection were established. Also, signs and symptoms of infection such as melanization, phagocytosis, hemocytes count and yeast filamentation within the larva, were studied in *C. tropicalis*. The results allowed us to confirm that *G. mellonella* is susceptible to infection by the different pathogenic fungi, and at the same time allows us to distinguish between strains with different virulence capabilities. The optimal inoculum to infect larvae with *C. tropicalis* was 2×10^6 /larva and in *Aspergillus* spp it was 10^6 conidia/larva. In both cases, 37°C was selected as the optimum temperature to carry out the infection models and to establish the survival curves. Melanization of larvae occurs in response to the presence of live and inactivated fungal structures. Haemocytes phagocytosed yeast of *C. tropicalis* and the density of these cells decreased during infection. *Candida tropicalis* yeasts proliferated and formed pseudohyphae in larval tissue around which structures granuloma-like were formed.

Next, using strains that were susceptible and resistant to different antifungal agents, we assessed the usefulness of the *G. mellonella* host to evaluate the treatment efficacy of larvae infected with *C. tropicalis* and *Aspergillus* spp. The model was standardized with drugs belonging to all the antifungal families in clinical use: amphotericin B, fluconazole, voriconazole, and anidulafungin, as a representative of the echinocandins. Different doses, including the equivalent to the therapeutic one used in

humans, were tested. The results show a good correlation between the effectiveness of all antifungal *in vivo* and the susceptibility/resistance profile *in vitro* of the different species.

Conclusions: i) Oxidative stress is involved in the fungicidal activity of amphotericin B. ii) The decrease of ROS production and/or activation of antioxidant mechanisms are related to amphotericin B resistance, even in the absence of ergosterol. Other factors, such as change in mitochondrial membrane potential, increased cell wall thickness and detection of β -1,3-glucans, Congo red resistance growth delay, were also identified in resistant strains to amphotericin B. iii) Cross resistance between amphotericin B and azoles in *C. tropicalis* is the result of the absence of ergosterol in the cell membrane as a result of mutations in key enzymes of the ergosterol biosynthetic pathway (Erg3p and Erg11p). iv) *Galleria mellonella* is a valid alternative model to investigate different aspects of clinical mycology, such as fungal virulence and *in vivo* evaluation of the efficacy and toxicity of antifungals. v) Susceptibility or resistance to antifungal agents *in vitro* correlates with the *in vivo* response or therapeutic failure in the susceptible host *G. mellonella*.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

La incidencia de las infecciones fúngicas oportunistas ha aumentado significativamente en las últimas décadas y actualmente representan un importante problema de salud para el hombre. Este incremento se ha producido principalmente por el creciente número de pacientes con tratamientos inmunosupresores por trasplante, de pacientes oncológicos, neutropénicos, enfermos que han sufrido cirugía grave (principalmente abdominal) o pacientes inmunodeprimidos por la infección causada por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Existen también otros factores que contribuyen a la aparición de nuevos casos de infecciones fúngicas y hacen a los pacientes más vulnerables, como el uso de antibióticos de amplio espectro, la hospitalización prolongada, la nutrición parenteral, la edad avanzada y la diabetes (Pfaller y Diekema, 2010; Binder y Lass-Flörl, 2011; Peman y Salavert, 2012; Pierce y Lopez-Ribot, 2013).

La presentación de las infecciones fúngicas pueden variar desde formas superficiales (piel y mucosas) a invasivas o diseminadas. Las últimas están asociadas a altas tasas de morbilidad y mortalidad a pesar de la disponibilidad de antifúngicos con diferentes espectros de actividad (Perfect, 2013). Además, la aparición de infecciones fúngicas incrementa el coste del tratamiento del paciente, debido fundamentalmente al elevado precio de los tratamientos antifúngicos, de tal manera que una infección fúngica aumenta en unos 30.000-50.000 euros el tratamiento. Si a este hecho añadimos el uso masivo de antifúngicos en tratamientos empíricos y en profilaxis, utilización comprensible si se tiene en cuenta el mal pronóstico de algunas de estas infecciones, podemos esperar como resultado un incremento de cepas resistentes, empeorando el pronóstico.

La epidemiología de las infecciones fúngicas ha cambiado de manera importante en los últimos años, y aunque especies de los géneros *Candida*, *Aspergillus* y *Cryptococcus* son las más frecuentes, es notoria la emergencia de nuevas especies, algunas de ellas con baja sensibilidad o resistentes a los principales antifúngicos de uso clínico (Pfaller y Diekema, 2007 y 2010).

1.1. Principales infecciones causadas por hongos patógenos

Las enfermedades fúngicas invasoras las causan principalmente levaduras u hongos filamentosos. A continuación se describen las características más relevantes de las infecciones más frecuentes causadas por estos microorganismos.

1.1.1. Infecciones causadas por levaduras

Las principales levaduras patógenas oportunistas pertenecen a los géneros *Candida* y *Cryptococcus*. Dentro del género *Candida*, se ha descrito un número importante de especies patógenas. Estas levaduras hacen parte de la flora habitual y pueden estar transitoriamente en la piel. En contraste, las especies de *Cryptococcus* spp, son ambientales y la infección se adquieren por inhalación. En los últimos años, aunque en menor proporción, han aumentado los casos de infecciones por otras levaduras.

1.1.1.1. Candidiasis

La fuente de infección por levaduras del género *Candida* se encuentra principalmente en las mucosas y/o en la piel. El espectro de la candidiasis es amplio y abarca desde infecciones superficiales (infecciones orofaríngeas, vaginales y de piel) hasta formas más severas, como la candidiasis sistémica (Leroy y col., 2009; Pfaller y Diekema, 2010; Pierce y Lopez-Ribot, 2013). La candidiasis orofaríngea afecta al paladar duro y blando, la faringe, la lengua y la mucosa oral, y generalmente es uno de los primeros signos clínicos de la infección causada por el VIH (Patel y col., 2012). La candidiasis vulvovaginal supone una de las enfermedades fúngicas más frecuentes. Se estima que alrededor del 75% de las mujeres presentan al menos un episodio durante la vida. El incremento en la incidencia de este tipo de candidiasis se ha asociado al uso de antibióticos de amplio espectro y al aumento de pacientes inmunocomprometidos (Sobel, 2007).

La mayoría de las infecciones diseminadas e invasivas están causadas por levaduras del género *Candida* (70-90%) (Leroy y col., 2009). En Estados Unidos y Europa, estas levaduras ocupan el cuarto y sexto lugar, respectivamente, como causa de infección sanguínea de origen nosocomial (Wisplinghoff y col., 2004; Rodriguez-Creixems y col., 2008). Se ha calculado que la incidencia de candidiasis sistémica en Estados Unidos es aproximadamente de 20 casos por 100.000 habitantes, lo que supone un incremento de 20 veces comparado con el número de casos registrados al inicio de la década de los años 80 (Pierce y Lopez-Ribot, 2013). La candidemia tiene una mortalidad asociada de alrededor del 40-50% dependiendo de la población estudiada y de la especie

implicada (Horn y col., 2009; Leroy y col., 2009; Pierce y Lopez-Ribot, 2013). En España se han realizado en los últimos años estudios epidemiológicos para estimar la incidencia de las infecciones fúngicas invasoras. En el estudio FUNGEMYCA, en el cual participaron 44 hospitales, se encontró una incidencia de candidiasis de 0,88 casos/1.000 admisiones (Peman y col., 2012). Más reciente, otro estudio epidemiológico y de vigilancia de casos de candidemia, realizado en 29 instituciones hospitalarias de este país (estudio CANDIPOP), registró una incidencia de 0,89 casos /1.000 admisiones (Puig-Asensio y col., 2014).

Globalmente, *C. albicans* es la especie del género que tiene mayor importancia clínica y la que se aísla con mayor frecuencia de los casos de candidiasis (45-50%) (Del Palacio y col., 2009). Esta levadura forma parte de la flora de la cavidad oral en el 75% de la población. Las infecciones superficiales que causan no son letales. Sin embargo, en pacientes inmunodeprimidos, la diseminación se asocia a una alta mortalidad (Pfaller y Diekema, 2007). Los factores de riesgo más importantes para la candidiasis diseminada son las alteraciones en la mucosa gastrointestinal, la presencia de catéteres venosos y el uso de antibióticos de amplio espectro (Spellberg y col., 2012).

En los últimos años, especies de *Candida* no-*albicans* han aumentado significativamente su incidencia y suponen aproximadamente el 50% de todos los episodios de candidemia (Almirante y col., 2005; Horn y col., 2009). Entre estas especies se encuentran principalmente *C. glabrata* y *C. parapsilosis*, y en menor proporción *C. tropicalis* y *C. krusei*. Aunque la mayoría suelen ser menos virulentas que *C. albicans*, algunas son más resistentes a uno o varios antifúngicos o presentan tendencia a desarrollarla rápidamente (Chai y col., 2010). La distribución de las especies de *Candida* y la sensibilidad a los antifúngicos varía según estudios, normalmente de acuerdo a la región geográfica (Peman y Salavert, 2012).

Las infecciones por las especies *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis* (complejo “*psilosis*”) se relacionan principalmente con infecciones en neonatos y pacientes trasplantados. Además, su aparición está asociada principalmente al uso de catéteres venosos y a la alimentación parenteral (Almirante y col., 2006). En Europa, estas especies son la segunda causa de candidemia, especialmente en regiones mediterráneas. La mortalidad atribuida a las infecciones por *C. parapsilosis* se ha estimado en un rango entre el 10,5 - 23%, siendo una de las más bajas comparadas con el resto de candidiasis causadas por otras especies (Almirante y col., 2006; Chen y col., 2012; Parmeland y col., 2013). La principal característica de las especies del complejo “*psilosis*” es su reducida sensibilidad *in vitro* a equinocandinas.

Candida glabrata es una causa frecuente de infección en pacientes susceptibles como personas de edad avanzada. En Estados Unidos, es la segunda causa de candidiasis, mientras que en Europa es la tercera. Es una especie con sensibilidad reducida a los azoles que fácilmente desarrolla resistencia a fluconazol (FCZ) (Bennett y col., 2004; Noble y col., 2013). Esta levadura evolutivamente está más alejada del resto de especies patógenas del género *Candida*, estando más cercana a *Saccharomyces cerevisiae* (Dujon y col., 2004; Gabaldon y col., 2013).

Candida tropicalis se encuentra entre la tercera o cuarta causa de infección (aproximadamente 30% de las infecciones) por especies de *Candida* no-*albicans* (Arendrup y col., 2002; Almirante y col., 2005; Kucukates y col., 2005; Chai y col., 2010). La candidemia causada por esta especie está relacionada con altas tasas de mortalidad (alrededor del 50%) (Chai y col., 2010). Los principales factores de riesgo para las infecciones por esta levaduras son el cáncer, trastornos hematológicos, tratamientos con corticosteroides, el uso de catéteres y la administración de antibióticos de amplio espectro (Chai y col., 2010; Bassetti y col., 2011; Munoz y col., 2011; Negri y col., 2012; Peman y col., 2012). A pesar de que *C. tropicalis* es sensible a la anfotericina B (AmB), a los azoles y a las equinocandinas, en los últimos años se ha observado una tendencia a la disminución de la susceptibilidad a los azoles. Recientemente, se ha descrito que la resistencia al voriconazol (VCZ) es más frecuente en esta especie que en *C. albicans* o *C. parapsilosis* (Cuenca-Estrella y col., 2011; Guinea y col., 2014; Puig-Asensio y col., 2014). También, se ha demostrado disminución en la sensibilidad al FCZ (Antoniadou y col., 2003; Tortorano y col., 2012). Por último, *C. krusei* es una levadura poco virulenta e invasiva en comparación con otras especies posiblemente por la sensibilidad a la acción de los granulocitos. Por ello, los pacientes con mayor riesgo de padecer fungemia, son neutropénicos o aquellos que padecen enfermedades hematológicas. El principal factor de virulencia de *C. krusei* es la hidrofobicidad de su pared celular, lo que favorece tanto la adhesión a tejidos como a superficies inertes (Samaranayake y Samaranayake, 1994; Arendrup, 2013). La característica más importante de esta levadura es su resistencia intrínseca a al FCZ y la baja sensibilidad a otros antifúngicos por lo que el tratamiento de estas infecciones puede ser difícil.

1.1.1.2. Criptococosis

Cryptococcus spp. son los agentes etiológicos de la criptococosis, una infección de distribución mundial que se adquiere por la inhalación de basidiosporas del ambiente. Las especies más frecuentes son *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*, las cuales son diferentes en la epidemiología y en los cuadros clínicos que producen. El

hábitat de *C. neoformans* es el suelo o materia orgánica contaminada con guano de aves, mientras que el de *C. gattii* se asocia con árboles de eucalipto en regiones tropicales y subtropicales (Ngamskulrungron y col., 2012). A diferencia de *C. neoformans*, que afecta especialmente individuos inmunodeprimidos, la infección por *C. gattii* es más frecuente en individuos inmunocompetentes (Byrnes y col., 2011).

Dentro del género *Cryptococcus*, *C. neoformans* es la especie que con más frecuencia causa infección. Se calcula que anualmente se infectan alrededor de 1.000.000 personas con esta levadura. En los países desarrollados con la implementación de la terapia antirretroviral altamente activa (HAART), el número de personas infectadas ha disminuido aunque la mortalidad asociada a la infección no ha cambiado (Dromer y col., 2007). En los países en vías de desarrollo, la infección por esta levadura continua siendo una causa importante de mortalidad (alrededor de 650.000 muertes/año) (Park y col., 2009). La infección en pacientes inmunocompetentes es asintomática pero en aquellos que presentan alteraciones del sistema inmune, la principal manifestación es la meningoencefalitis (Fries y Cox, 2010).

1.1.1.3. Otras levaduras

Otras levaduras menos frecuentes pero con impacto en la salud humana son: *Rhodotorula* spp., *Geotrichum capitatum*, *Pichia* spp., *Saccharomyces cerevisiae* y *Trichosporon* spp. En concreto, el género *Trichosporon* forma parte de la microbiota en diferentes partes del cuerpo humano, son resistentes a la mayoría de los antifúngicos, y aunque causan un bajo porcentaje de casos de infección fúngica invasiva, representan la segunda o tercera causa de fungemia, después de la candidiasis. Los individuos más susceptibles a infecciones por *Trichosporon* spp. son los pacientes con leucemia. Se estima que la tasa de mortalidad por estos hongos oscila entre 60-80 %. El tratamiento de estas infecciones representa un reto terapéutico por su reducida sensibilidad a los principales antifúngicos de uso clínico (Richardson y Lass-Flörl, 2008; Colombo y col., 2011).

1.1.2. Infecciones por hongos filamentosos

Actualmente los hongos filamentosos de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Scedosporium*, *Penicillium* y algunos zigomicetos, constituyen un problema de salud para el hombre. El hábitat de estos microorganismos se encuentra en el aire, en el suelo, en fuentes de agua o en material vegetal en descomposición. Algunos son fitopatógenos (Boutati y Anaissie, 1997; Dagenais y Keller, 2009) y aunque la incidencia de infecciones por hongos filamentosos es menor que la infección por levaduras, la mortalidad suele ser

mayor. En un estudio multicéntrico reciente llevado a cabo en unidades de cuidados intensivos en Italia se describe una incidencia de 2,3 y 16,5 casos/1.000 admisiones y una tasa de mortalidad de 61,5% y 40,2% por hongos filamentosos y levaduras, respectivamente (Montagna y col., 2013). En España, un estudio de población llevado a cabo en 2011 en 29 hospitales (estudio FILPOP) reveló una prevalencia de infección por hongos filamentosos de un 0,16/100.000 habitantes (Alastruey-Izquierdo y col., 2013).

1.1.2.1. Aspergilosis

El género *Aspergillus* está compuesto por especies que pueden producir presentaciones clínicas con diferente severidad que van desde cuadros alérgicos, como la aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA), aspergilomas (crecimiento del hongo dentro de una cavidad preexistente), hasta formas más graves como la infección pulmonar o la aspergilosis diseminada (Latge, 1999). *Aspergillus fumigatus*, causa aproximadamente el 90% de las aspergilosis y es el agente más importante de enfermedad fúngica invasora (EFI) por hongos filamentosos en pacientes neutropénicos o trasplantados (de órganos sólidos o de progenitores hematopoyéticos). Otras especies, como *A. terreus*, *A. flavus*, *A. nidulans* y *A. niger*, presentan una incidencia creciente entre enfermos susceptibles (Latge, 1999; Kontoyiannis y col., 2002; Lass-Flörl y col., 2005; Krishnan y col., 2009).

Aspergillus lentulus es una especie morfológicamente similar a *A. fumigatus* dentro de la sección *Fumigati* (Balajee y col., 2005). Esta especie es de particular interés ya que difiere de *A. fumigatus* en virulencia y en el perfil de susceptibilidad a los antifúngicos, con una menor sensibilidad a los azoles, a la AmB y a las equinocandinas (Alcazar-Fuoli y col., 2008; Staab y col., 2010). *Aspergillus lentulus*, a pesar de ser menos virulento que *A. fumigatus*, se ha aislado de pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica y fibrosis quística (Alhambra y col., 2008; Staab y col., 2010; Symoens y col., 2010).

Aspergillus terreus es clínicamente importante porque además de causar infecciones superficiales como onicomycosis, está involucrado en casos de aspergilosis invasiva en pacientes inmunocomprometidos. En estos casos se asocia a una significativa morbilidad y mortalidad dada la baja sensibilidad o resistencia a la AmB, y en algunos casos, a otros antifúngicos (Ruping y col., 2011; Fernandez y col., 2013).

1.1.2.2. Otros hongos filamentosos

Las infecciones por *Fusarium* spp. y *Scedosporium* spp. son menos frecuentes que las causadas por *Aspergillus* spp. pero suelen llegar a ser más graves por el tipo de pacientes a los que afectan y/o por la baja respuesta o multiresistencia a los antifúngicos la cual se correlaciona con la falta de respuesta clínica al tratamiento. Algunas especies del género *Fusarium* spp. causan infecciones severas en pacientes con trastornos hematológicos que reciben terapia citotóxica o trasplantados tratados con corticosteroides (Nucci y col., 2013). Las especies de *Fusarium* son intrínsecamente resistentes al itraconazol (ITZ) y a las equinocandinas y tienen sensibilidad variable a AmB y a VCZ (Muhammed y col., 2011; Esnakula y col., 2013). Los zigomicetos, son otro grupo de importancia clínica por la alta mortalidad que causan (Richardson y Lass-Flörl, 2008).

1.1.2.3. Hongos endémicos

Otro grupo de hongos de importancia clínica son los que causan las conocidas micosis endémicas cuyos principales agentes etiológicos son *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis/posadassi* y *Paracoccidioides brasiliensis*. Estos hongos son patógenos primarios dado que causan también enfermedad en individuos inmunocompetentes. Son hongos dimórficos térmicos ya que su fase saprofítica, en la que se encuentra a temperatura ambiente, es la micelial y hacen la transición a la fase de levadura o forman esferulas (fase parasitaria) a temperatura fisiológica (37°C) (Rappleye y Goldman, 2006).

1.2. Estructuras básicas de los hongos

A diferencia de otras células eucariotas, los hongos presentan una pared celular que es esencial para su supervivencia. Esta estructura constituye una diana selectiva para el desarrollo de antifúngicos ya que no se encuentra en células humanas. En general, la pared fúngica se compone de una matriz de ramificaciones de polisacáridos de glucosa (quitina, glucanos y manoproteínas) que varía entre géneros y especies. En la mayoría de los hongos, la base de la pared celular la conforman β -1,3/1,6-glucanos unidos a la quitina (polisacárido de N-acetilglucosamina) por enlaces β -1,4. Sin embargo, *A. fumigatus* contiene además β -1,3/1,4-glucanos y galactomanano (Fontaine y col. 2000). Este último componente es la base de una prueba diagnóstica ya que se puede detectar en sangre de pacientes con aspergilosis (Fontaine y col., 2000; Maertens y col., 2004). A diferencia de *A. fumigatus*, *S. cerevisiae* tiene β -1,3/ β -1,6-glucanos en la pared (Kollar y col., 1995; Fontaine y col., 2000; Latge y col., 2005). Por otro lado, en los

basidiomicetos como *Cryptococcus* spp. el contenido de β -1,3-glucanos es significativamente más bajo en comparación con otros hongos (James y col., 1990).

La membrana plasmática de los hongos se caracteriza por la presencia de ergosterol (aproximadamente entre 5 y 30%) a diferencia de las membranas celulares de los mamíferos, donde el colesterol es el principal esteroide. El ergosterol es esencial en la estabilidad y fluidez de esta estructura celular fúngica (Nes y col., 1978). Por ello, esta molécula y su vía de síntesis constituyen la diana de dos familias de antifúngicos: los polienos y los azoles (ver revisión en Masia Canuto y Gutierrez Rodero, 2002).

Los hongos son eucariotas y como tal la gran mayoría de rutas metabólicas son similares a la de organismos superiores como los vertebrados, aunque también se encuentran algunas diferencias. En vertebrados, el transporte de electrones sigue una secuencia lineal a través de la cadena respiratoria clásica compuesta por el complejo I (NADH:ubiquinona oxidoreductasa), complejo II (succinato:ubiquinona oxidoreductasa), coenzima Q (CoQ, ubiquinona), complejo III (ubiquinona:citocromo C oxidoreductasa), complejo IV (citocromo C oxidasa) y complejo V (ATP sintasa). El producto final de esta organización es la reducción del oxígeno para producir agua (Mitchell, 1961). En los hongos, la respiración tiene características particulares porque pueden carecer de complejos (como es el caso de *S. cerevisiae* que carece del complejo I) o tener rutas de transferencia de electrones adicionales como es la oxidasa alternativa (AOX), que transfiere electrones desde el complejo II al O₂. En algunos hongos, se ha descrito una cadena de transporte de electrones paralela (Par) en la que los electrones son transferidos a través de citocromos C paralelos (Joseph-Horne y col., 2001; Milani y col., 2001; Ruy y col., 2006). Además, los hongos suelen tener NADH deshidrogenadas adicionales que introducen electrones a la cadena respiratoria por la coenzima Q como lo hace el complejo I (Joseph-Horne y col., 2001) (Figura 1.1).

1.3. Interacción huésped-patógeno

La infección fúngica es un proceso complejo que depende tanto de factores del hongo como del estado inmune del paciente. En el caso de los hongos oportunistas, el estado inmune es el que determina que estos microorganismos se comporten como comensales o como patógenos (Casadevall y Pirofski, 2003).

En general, la mayoría de los hongos proliferan y causan enfermedad diseminada e invasiva por su capacidad de adaptarse al ambiente del huésped (respuesta inmune, estrés oxidativo, ambiente nutricional y temperatura fisiológica) y por la presencia de

factores de virulencia que tienen efectos deletéreos y contribuyen al desarrollo de la infección.

Uno de los principales mecanismos de adaptación de los hongos es la termotolerancia.

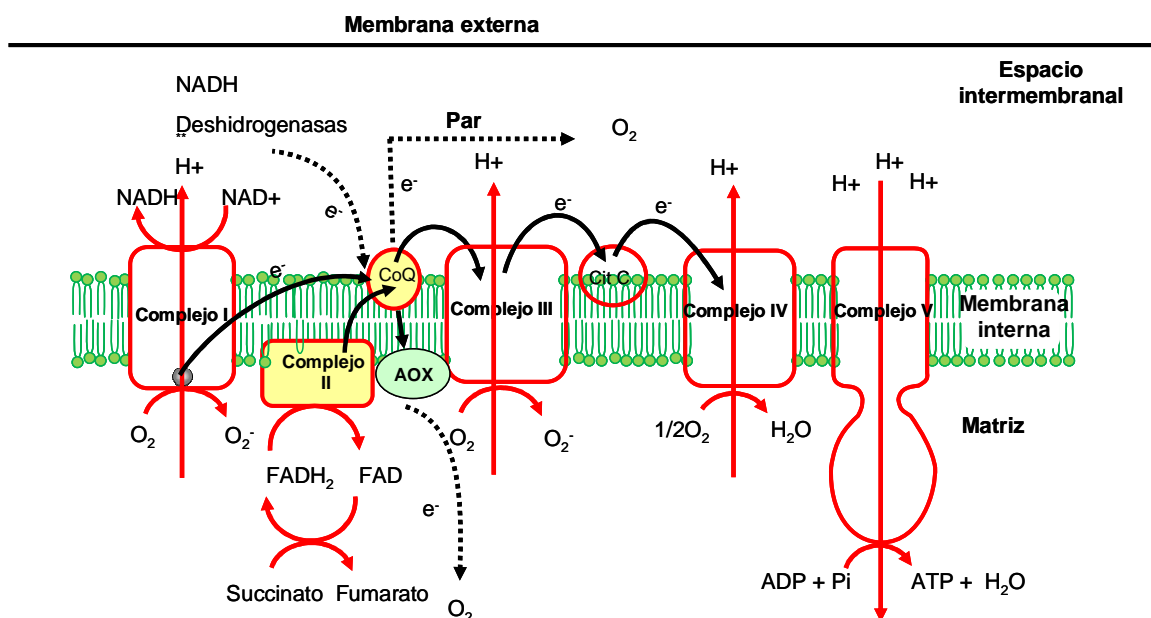


Figura 1.1. Representación esquemática de la cadena transportadora de electrones y sitios de generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Figura adaptada de: (Ruy y col., 2006; Macedo-Márquez, 2012) y <http://www.bioquimicaqui11601.ucv.cl/unidades/cte/traselectfofox21fid.html>. Las líneas punteadas representan las rutas adicionales a la cadena transportadora de electrones en los hongos (NADH deshidrogenada, AOX y paralela).

La mayoría de estos microorganismos, crecen en un rango de temperaturas entre 12 y 30°C, pocos toleran temperaturas más altas como es la temperatura fisiológica del hombre y de otros vertebrados (Baxter y Illston, 1980; Gillum y col., 1984; Robert y Casadevall, 2009). Por ello, la capacidad de crecer a esta temperatura supone una ventaja selectiva para poder adaptarse al ambiente del huésped y causar infección.

La adhesión a tejidos a superficies inertes (en las que pueden formar biopelículas, es un paso inicial en la infección fúngica en el que tienen un papel importante las adhesinas (proteínas glicosiladas) (Staab y col., 1999; Halliwell y col., 2012). Una vez adheridos, los hongos invaden el tejido a través de la filamentación, de la producción de enzimas líticas tipo proteasas o fosfolipasas, y/o ingresando a células del sistema inmune, como los macrófagos, en donde se pueden multiplicar y mantener la infección (Seider y col., 2010; Li y col., 2012; Park y col., 2013).

La fagocitosis es uno de los mecanismos de defensa más importantes frente a microorganismos patógenos. Sin embargo, algunas especies de hongos han desarrollado

estrategias para evitar la muerte por parte del macrófago y reproducirse intracelularmente. Las estrategias de supervivencia pueden variar de acuerdo al hongo. Las especies más comunes de *Candida*, pueden evadir la muerte y dividirse dentro de los macrófagos, causando daño y muerte de la célula fagocítica (García-Rodas y col., 2011). Sin embargo, las especies de *Candida* no se consideran patógenos intracelular ya que las células no constituyen un nicho natural durante la infección, a diferencia de otros hongos como *Histoplasma* spp. y *Cryptococcus* spp. Estos patógenos pueden sobrevivir dentro de los fagocitos a través de mecanismos diferentes. En el caso de *H. capsulatum*, se produce la inhibición de la fusión fagosoma-lisosoma tras la fagocitosis, impidiendo la acidificación del fagosoma y activación de las hidrolasas ácidas (Eissenberg y col., 1993). Por el contrario, durante la fagocitosis de *C. neoformans* si hay fusión fagosoma-lisosoma, aunque esta estructura es permeable, y por lo tanto, tiene afectada su funcionalidad (Tucker y Casadevall, 2002). En el fagolisosoma, las células fagocíticas producen especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*) y nitrógeno, las cuales se sintetizan por la activación de la NADPH-oxidasa y de la óxido nítrico sintasa inducible, respectivamente. Por ello, la inducción de sistemas antioxidantes, como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa o el sistema del glutatión, son importantes para la supervivencia de microorganismos patógenos en el huésped porque le ayudan a evadir la muerte inducida por estrés oxidativo (Imlay, 2003; Brown y col., 2007). Algunos hongos se protegen del efecto del estrés oxidativo intracelular gracias a la presencia de una cápsula que rodea el cuerpo celular como sucede con *Cryptococcus* spp o porque son capaces de acumular melanina, como lo hace además de *Cryptococcus* spp. *P. brasiliensis*, *S. schenkii* o *Aspergillus* spp., entre otros (Gómez y Nosanchuk, 2003; Hayakawa y col., 2006; Zaragoza y col., 2008; Mauch y col., 2013).

Los hongos, en respuesta a estrés, pueden también reestructurar la pared evitando así la interacción con células del sistema inmune importantes en el control de la infección (Nather y Munro, 2008).

En algunos hongos se han hallado proteínas similares a las intergrinas humanas (mimetismo molecular). El desarrollo de una respuesta inmune frente a estas proteínas homólogas puede dar lugar a una reacción autoinmune en la que se reconocen no sólo los elementos del patógeno, sino también del huésped. Por esta razón, algunas infecciones resultan en el desarrollo de cuadros alérgicos crónicos (Gustafson y col., 1991; Cramer y col., 2006).

1.4. Tratamiento de las infecciones fúngicas

El número de fármacos utilizados para el tratamiento de las infecciones fúngicas es escaso en comparación con el número de antibióticos disponibles para las infecciones bacterianas. Actualmente, el tratamiento de las infecciones fúngicas invasoras se basa en el uso de tres familias de antifúngicos: polienos (AmB), azoles (FCZ, VCZ, ITZ, posaconazol (PCZ) y equinocandinas: caspofungina (CAS), micafungina (MCF), y anidulafungina (ANF). Durante los últimos 50 años, el descubrimiento de los diferentes antifúngicos ha sido progresivo, iniciándose con la AmB hasta llegar a las equinocandinas (Figura 1.2).

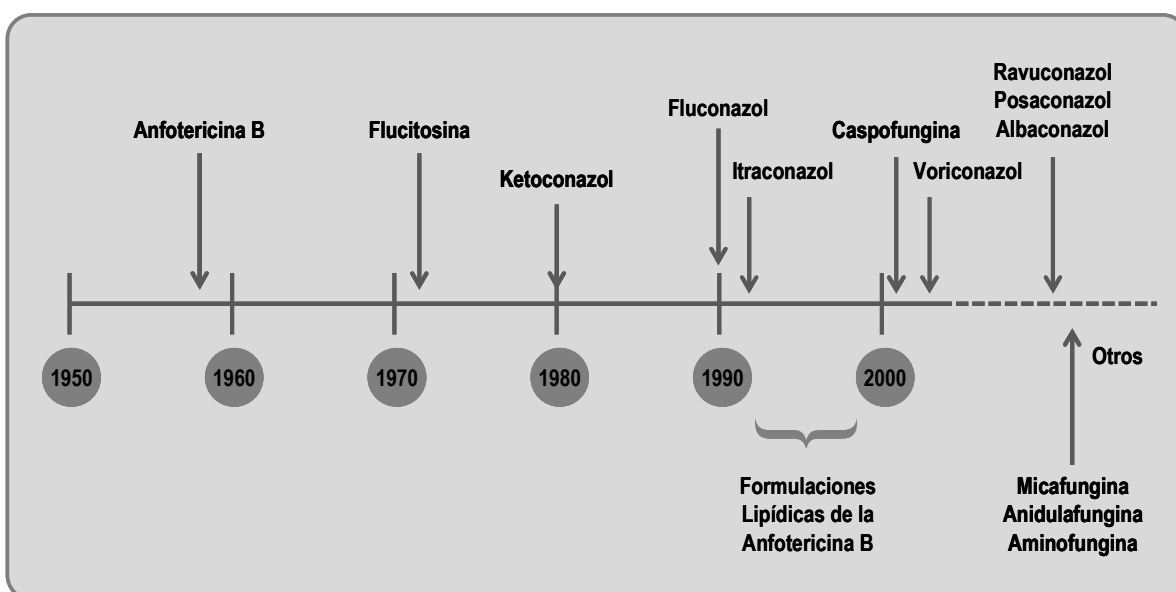


Figura 1.2. Desarrollo cronológico de los diferentes antifúngicos. Adaptado de <http://www.mednet-cl/link.cgi/Medwave/PuestaDia/Cursos/3555>.

El uso clínico de los diferentes antifúngicos está limitado por diversas razones como son: (i) la resistencia intrínseca que presentan algunos hongos a uno o varios antifúngicos, (ii) el desarrollo de resistencia secundaria a los mismos, (iii) la toxicidad asociada y/o (iv) el elevado coste de algunos de ellos.

1.4.1. Polienos

El representante más conocido de este grupo de moléculas es la AmB (Figura 1.3). Este antifúngico fue descubierto en la década de los 50 a partir de una cepa de *Streptomyces nodosus* aislada de muestras de suelo de la región del Río Orinoco en Venezuela (Trejo y Bennett, 1963).

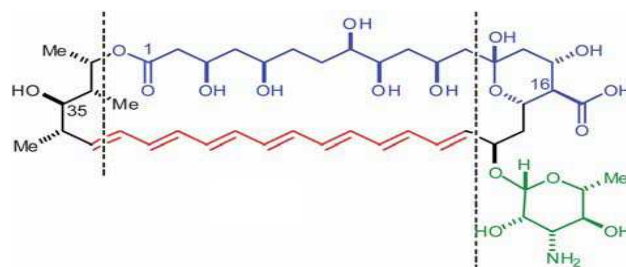


Figura 1.3. Estructura de la anfotericina B. Región hidrofóbica (rojo), región hidrofílica (azul). El grupo en color verde corresponde al azúcar micosamina, importante en la interacción con el ergosterol. Figura tomada de Volmer y col. (2010).

La AmB fue introducida en el mercado en 1958 y su primera presentación farmacéutica fue una solución de desoxicolato de sodio de administración intravenosa (Fungizone-Squibb®). Esta formulación fue considerada el tratamiento de referencia durante muchos años por su amplio espectro de actividad. Sin embargo, la neurotoxicidad de esta presentación llevó al desarrollo de formulaciones lipídicas, también de administración intravenosa, pero con menos efectos adversos como: (i) la dispersión coloidal (Amphotec®), (ii) el complejo lipídico (Abelcet®) y (iii) los liposomas (Ambisome®) (Laniado-Laborin y Cabrales-Vargas, 2009; ver revisión en Mesa-Arango y col., 2012). Las nuevas formulaciones tienen el inconveniente del alto coste por lo que su uso está muy limitado en regiones en vías de desarrollo. Actualmente, la AmB se continúa utilizando para el tratamiento de la meningoencefalitis causada por *Cryptococcus* spp. y la zigomicosis invasiva (Saag y col., 2000; Waness y col., 2009). Además, es la alternativa terapéutica para la aspergilosis, la candidiasis invasiva y otras infecciones fúngicas sistémicas (Gomez-Lopez y col., 2008; Fortun y col., 2011; Ullmann y col., 2012; Arendrup y col., 2014). En regiones en vías de desarrollo el desoxicolato de sodio, dado el bajo coste, se utiliza también para el tratamiento de la leishmaniasis mucocutánea o visceral (Purkait y col., 2012).

La AmB es el antifúngico de primera opción en neonatos, ya que estos pacientes no tienen los riñones totalmente desarrollados por lo tanto la nefrotoxicidad es menor que en adultos (Hope y col., 2012).

1.4.1.1. Mecanismo de acción de anfotericina B

Aunque AmB es un fármaco que se introdujo en el mercado hace más de cinco décadas, su mecanismo de acción aún no está completamente esclarecido. El primer mecanismo descrito fue la formación de canales en la membrana plasmática tras unirse al ergosterol. También se ha propuesto que el efecto antifúngico de la AmB está causado por inducción de estrés oxidativo.

1.4.1.1.1. Formación de canales en la membrana celular

El primer mecanismo de acción que se propuso para la AmB fue la formación de canales multiméricos en la bicapa lipídica de las células fúngicas tras la unión de varias moléculas al ergosterol a través de sus dominios hidrofóbicos (Finkelstein y Holz, 1973; Brajtburg y col., 1990). Estos canales incrementan la permeabilidad a pequeños iones, principalmente al K^+ , lo que causa la muerte celular por depleción de cationes monovalentes, protones y pequeños solutos (Odds y col., 2003; Volmer y col., 2010).

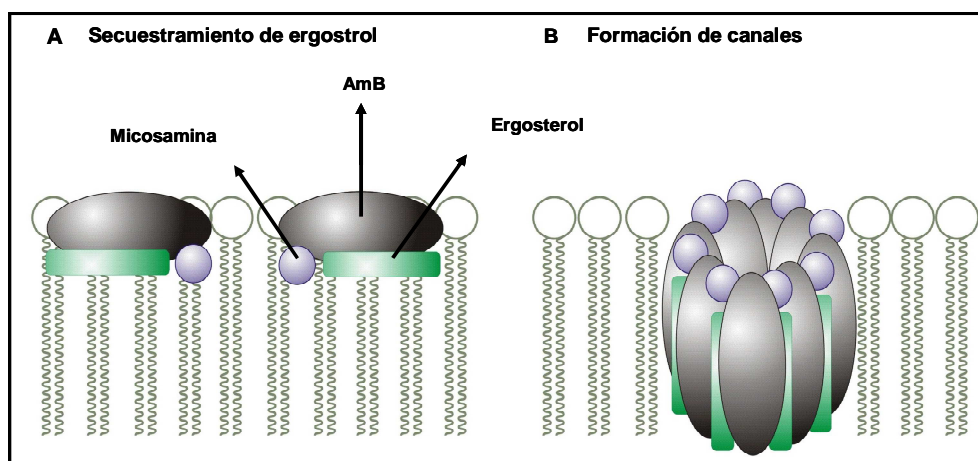


Figura 1.4. Mecanismos de acción para la AmB: A) Secuestro del ergosterol y B) Permeabilidad de la membrana por formación de canales. Adaptación de Palacios y col. (2011).

Por otro lado, existen trabajos que demuestran que la formación de canales no es estrictamente necesaria para la actividad antifúngica de la AmB (Chen y col., 1978; Brajtburg y col., 1990). Se ha demostrado que modificaciones químicas de la AmB en residuos que se consideran necesarios para la formación de canales, no afectan la actividad antifúngica. Este hallazgo está relacionado con resultados descritos para la natamicina que es otro polieno en el que su mecanismo de acción no se relaciona con la formación de canales a pesar de su inserción en la membrana celular fúngica (Palacios y col., 2007; te Welscher y col., 2010; Gray y col., 2012). Recientemente también se ha sugerido que la AmB actúa secuestrando el ergosterol de la membrana plasmática, por lo que la unión de la molécula al ergosterol puede ser suficiente para desestabilizar la membrana y producir el efecto fungicida (Palacios y col., 2011).

1.4.1.1.2. Inducción de estrés oxidativo

El otro mecanismo de acción propuesto para la AmB es la producción de radicales libres e inducción de daño oxidativo (Sokol-Anderson y col., 1986; Phillips y col., 2003;

Belenky y col., 2013). Las ROS se forman en las células de manera natural como subproductos de la reducción completa del oxígeno molecular a agua durante la respiración aerobia (Beckman y Ames, 1998). La mitocondria es la principal fuente de ROS a nivel intracelular, específicamente en el complejo I y III (Turrens, 2003). Las ROS más importantes son el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo (OH^\cdot) y el peroxinitrito ($ONOO^-$). La producción de ROS aumenta en respuesta a estímulos externos estresantes como las radiaciones, los antifúngicos, el ambiente intracelular en el huésped o la carencia de fuentes energéticas, entre otros. Los niveles altos de ROS pueden causar daño a componentes celulares importantes como las proteínas, los ácidos nucleicos, los lípidos, el ADN y los carbohidratos (Bilinski y col., 1989; Yakes y Van Houten, 1997; Cabiscol y col., 2000).

Como otros organismos eucariotas, los hongos tienen varios sistemas enzimáticos de detoxificación de radicales libres para protegerse del efecto deletéreo de las ROS, siendo la catalasa y la superóxido dismutasa (SOD) las más importantes. Asimismo, otras moléculas de naturaleza no enzimática también cumplen función antioxidante como el glutatión, la trehalosa y la tioredoxina (Collinson y Dawes, 1992; Jamieson, 1998; Temple y col., 2005). Se ha demostrado que la ruta MAPKs juega un papel importante en la protección de *C. albicans* frente al estrés oxidativo, en particular la vía dependiente de Hog1 (Arana y col., 2007; de Dios y col., 2010). Sin embargo, el mecanismo por el cual la AmB induce estrés oxidativo y su función en la actividad antifúngica no han sido explorados. Se ha descrito que AmB puede autooxidarse, actuando de forma directa como un agente prooxidante (Lamy-Freund y col., 1985; Sokol-Anderson y col., 1986). En *C. neoformans*, recientemente hemos demostrado que la producción de ROS es un evento previo a la pérdida de integridad de la permeabilidad de la membrana plasmática (Sangalli-Leite y col., 2011). Estos resultados concuerdan con el hecho de que AmB induce apoptosis en *C. albicans* como resultado de la producción de ROS (Phillips y col., 2003). Adicionalmente, la AmB no sólo induce la expresión de genes involucrados en la vía de síntesis de ergosterol sino también de genes relacionados con respuesta a estrés, lo que sugiere que este antifúngico tiene un efecto pleiotrópico en la célula (Liu y col., 2005; Hoehamer y col., 2010; Cao y col., 2013).

1.4.2. Azoles

Durante muchos años, la AmB y la flucitosina fueron los únicos antifúngicos disponibles para tratar micosis sistémicas. Entre la década de los 80 y el año 2000, de forma progresiva se fueron introduciendo los fármacos del grupo de los azoles, dividido

en dos subgrupos: los imidazoles ketoconazol (KCZ) y clotrimazol (CLZ), y los triazoles (FCZ, ITZ, VCZ y PCZ) (Figura 1.5). Este grupo de antifúngicos revolucionó la micología médica por su espectro de actividad y por sus limitados efectos adversos. Los azoles bloquean la síntesis del ergosterol uniéndose a la enzima 14- α esterol demetilasa (Erg11p). La inhibición de esta enzima induce acumulación de esteroides metilados como el lanosterol y el 14- α metil-3-6-diol que resultan tóxicos para la célula y afectan la integridad de la membrana (Lupetti y col., 2002). No obstante, este bloqueo de la síntesis del ergosterol tiene efecto fungistático.

El FCZ ha sido ampliamente utilizado para tratar las candidiasis invasoras hasta la comercialización de las equinocandinas. Sin embargo, al igual que el KCZ, el FCZ no tiene utilidad en la infecciones fúngicas por hongos filamentosos, puesto que la mayoría de ellos presentan resistencia intrínseca. En cambio, el VCZ es el fármaco más utilizado después de la AmB, para el tratamiento de infecciones fúngicas invasoras causadas por hongos filamentosos, debido a su amplio espectro de actividad.

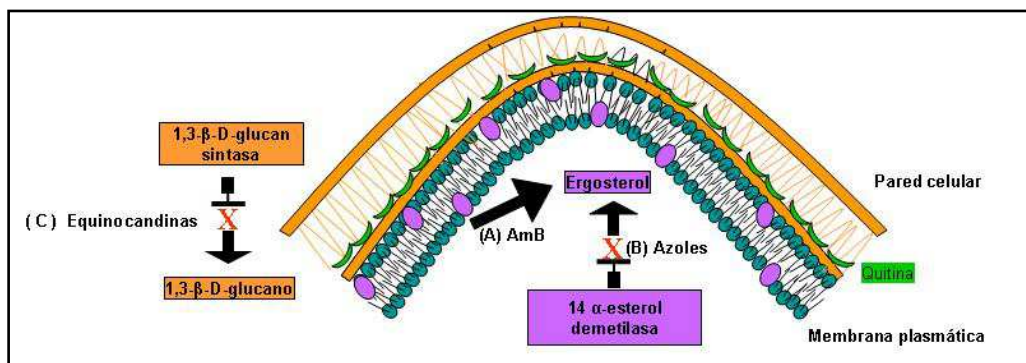


Figura 1.5. Blanco de acción de los principales antifúngicos. A) Anfotericina B (AmB) unida al ergosterol. B) Azoles que inhiben la enzima 14 α -esterol demetilasa y C) Equinocandinas que inhiben la enzima 1,3 β -glucano sintasa. Figura adaptada de Masia Canuto y Gutierrez Roderio (2002).

1.4.3. Equinocandinas

Las equinocandinas son hexapéptidos semisintéticos que se han convertido en el fármaco de primera elección para el tratamiento de las candidiasis invasivas. Este grupo de antifúngicos son los que presentan mayor especificidad por las células fúngicas debido a que su diana es la pared celular. Esta característica los sitúa en una posición privilegiada por su baja toxicidad. Las equinocandinas inhiben la β -1,3-glucano sintasa, la cual sintetiza los β -1,3-glucanos de la pared celular. De esta manera, las equinocandinas interfieren en la integridad de la pared celular y por lo tanto causan pérdida de viabilidad del hongo (Denning, 2003). Las equinocandinas son activas frente especies de *Candida*

spp., y *Aspergillus* spp., aunque tienen diferente efecto en cada hongo. Así, son fungicidas frente a levaduras y fungistáticas frente a hongos filamentosos. Una limitación de estos fármacos es la resistencia intrínseca que presentan hongos como *Fusarium* spp. y basidiomicetos (*Cryptococcus* spp.).

1.5. Mecanismos de resistencia a los antifúngicos

Para referirse a la resistencia a los antifúngicos hay que distinguir dos conceptos fundamentales. En primer lugar, la resistencia clínica que se puede definir como crecimiento o falta de inhibición de un microorganismo en el foco de infección, aunque en el mismo existan concentraciones terapéuticas del fármaco en cuestión. En este caso, la resistencia depende del fármaco, del paciente o de ambos, más que del microorganismo que produce la infección. Por otro lado, la resistencia microbiológica depende de las características particulares del microorganismo y se puede subdividir en: (i) *resistencia intrínseca*, que es aquella que se da cuando todas las cepas de una misma especie o género son resistentes al antifúngico y además no tiene relación con la exposición al fármaco; (ii) *resistencia primaria* es la que ocurre en una especie de cepas normalmente sensibles a un antifúngico cuando aparecen espontáneamente cepas resistentes sin haber estado en contacto previo con el antifúngico; y (iii) *resistencia secundaria o adquirida* es la que se desarrolla después de la exposición a los antifúngicos y que puede ser debida a alteraciones fenotípicas o genotípicas que se pueden manifestar de forma estable o transitoria.

1.5.1. Resistencia a la anfotericina B

La resistencia adquirida o secundaria a AmB es poco frecuente, por lo que los mecanismos involucrados en la misma son poco conocidos. La resistencia primaria o intrínseca a este fármaco se ha asociado con la disminución en el contenido de ergosterol en la membrana celular (Bolard, 1986; Ghannoum y Rice, 1999). En la mayoría de estos casos se ha encontrado alteración en la vía de síntesis del ergosterol con acumulación de esteroides intermediarios no tóxicos para la célula (Ghannoum y Rice, 1999; Walsh y col., 2003; Vandeputte y col., 2007). En levaduras se ha encontrado que la mutación de la enzima $\Delta 5,6$ esterol desaturasa (producto del gen *ERG3*), implicada en la síntesis del ergosterol, confiere resistencia a la AmB. Sin embargo, esta mutación normalmente se acompaña de mutaciones en el gen *ERG11*, lo que produce resistencia cruzada a la AmB y a los azoles. En cambio, en otros estudios no se ha encontrado relación entre el contenido de ergosterol y la resistencia a AmB (Dannaoui y col., 2000; Walsh y col., 2003; Blum y col., 2008). Por otro lado, la resistencia a AmB también se ha asociado con cambios en la composición de la pared celular (Gale y col., 1975; Seo y col., 1999). La

activación de mecanismos antioxidantes como el incremento en la actividad catalasa, es otro factor asociado a la resistencia a AmB como se ha demostrado en *C. albicans* (Sokol-Anderson y col., 1988; Blum y col., 2008). La resistencia a AmB en *Leishmania donovani*, también se relacionando con incremento en la expresión de genes involucrados en la detoxificación de ROS y activación de bombas de flujo del tipo ABC (Richardson y Lass-Flörl, 2008; Purkait y col., 2012).

A pesar de que la resistencia secundaria o adquirida tiene poca importancia clínica por la baja frecuencia en la que ocurre, hay especies de hongos patógenos que son intrínsecamente resistente a este antifúngico, como *A. terreus*, *Scedosporium* spp., *Trichosporon* spp. y *Malassezia furfur* (Richardson y Lass-Flörl, 2008). Además, la susceptibilidad de *Fusarium* spp. es variable y dependiente de la especie y/o de la cepa (Boutati y Anaissie, 1997).

1.5.2. Resistencia a los azoles

En levaduras, la resistencia secundaria a los azoles ha surgido debido al uso de estos antifúngicos en tratamientos prolongados o en casos de profilaxis en pacientes susceptibles de adquirir infecciones fúngicas (Pappas y col., 2009). El mecanismo de resistencia a los azoles que se describe con mayor frecuencia en *C. albicans* y *C. glabrata*, está relacionado con la activación o el aumento de expresión de los genes que codifican bombas de flujo provocando una disminución de las concentraciones intracelulares del fármaco (Rex y col., 1995; Sanglard y col., 1995; Torelli y col., 2008; Noble y col., 2013). Los productos de estos genes se agrupan en tres clases diferentes (i) transportadores ABC (del inglés *ATP Binding Cassette*), que son proteínas de membrana, pertenecientes a la familia de transportadores que consumen ATP y que están codificados por los genes *PDR5/CDR*, *MRP/CFTR*, *PDR16* y *MDR*, (ii) transportadores MFS (del inglés “Major Facilitators Superfamily”), codificados por el gen *CaMDR1*, y (iii) factores reguladores de la transcripción de los genes anteriormente descritos (*MRR1*, *UPC2* y *TAC1*) (Perea y col., 2001; Vermitsky y Edlind, 2004; García-Effron y col., 2008). En distintos hongos filamentosos también se han descrito genes homólogos a los descritos para levaduras: *A. fumigatus* (*MDR*) (Rajendran y col., 2011), *A. flavus* (*MDR1*) (Natesan y col., 2013), *A. nidulans* (*atrA*, *atrB* y *atrC*) (Semighini y col., 2002) y *Penicillium digitatum* (*PMR1*, *PMR5*) (Sun y col., 2013), todos estos genes pertenecen a la familia de los transportadores ABC. El aumento de su expresión se relaciona con la resistencia a diversos compuestos con actividad antifúngica, pero no directamente con la resistencia a los azoles de uso clínico.

La resistencia a este grupo de antifúngicos también se puede producir por alteraciones en la enzima diana de los azoles, 14- α esterol demetilasa, la cual es codificada por el gen *ERG11*, o por el aumento de expresión del mismo. Las mutaciones puntuales del *ERG11* se traducen en cambios de aminoácidos en Erg11p, que alteran la afinidad de la enzima por el azol, normalmente sin alterar la unión al substrato ni la funcionalidad. Este mecanismo se ha identificado en diferentes especies de *Candida* (Cowen y Steinbach, 2008; Hull y col., 2012; Warrilow y col., 2012). En *C. albicans*, las mutaciones con sustituciones de aminoácidos, asociadas a resistencia, más conocidas son: Y132H, N136Y, Y447H, G464S, F126L, D278E, S405F, G450E, R467K, T315A y la I471T (Lamb y col., 1997; Manavathu y col., 1999; Morschhauser, 2002; Vandeputte y col., 2005). Por otro lado, las sustituciones pueden llevar a la pérdida de la actividad de la enzima alterando la síntesis de ergosterol y la aparición de mecanismos compensatorios, que involucran alteraciones en otras enzimas de la vía de síntesis del ergosterol como la Δ 5,6-esterol desaturasa (Erg3p) (Cowen y Steinbach, 2008; Hull y col., 2012).

La resistencia intrínseca de *C. krusei* a FCZ se debe a que la 14- α esterol demetilasa es poco sensible al efecto inhibitorio del fármaco dado que la interacción con la diana no es lo suficientemente eficaz para ejercer su acción antifúngica (Orozco y col., 1998; Fukuoka y col., 2003). Un mecanismo similar ha sido descrito en la resistencia intrínseca a VCZ en *A. lentulus* (Alcazar-Fuoli y col., 2011). En *A. fumigatus*, las mutaciones puntuales del gen *cyp51A*, es el mecanismo de resistencia secundaria a los azoles encontrado en la mayoría de las cepas (Díaz-Guerra y col., 2003; Mellado y col., 2004; Mellado y col., 2007; Bader y col., 2013). La combinación de mutaciones puntuales con un incremento en los niveles de expresión de *cyp51* causa multiresistencia a los azoles en *A. fumigatus* (Mellado et al., 2007).

1.5.3. Resistencia a equinocandinas

El mecanismo de resistencia a equinocandinas más conocido está asociado a mutaciones en dos regiones de los genes que codifican la β -1,3-glucano sintasa (*FKS*), que son conocidos como “puntos calientes” (HS, del inglés “hot spots”), las cuales causan una reducción en la afinidad de la enzima por el antifúngico (Perlin, 2007). Además, se ha descrito que mecanismos compensatorios en la síntesis de la pared (como un incremento de la quitina) pueden contrarrestar la disminución de β -1,3- glucanos y causar resistencia a este grupo de antifúngicos (Walker y col., 2013).

Candida parapsilosis y *C. guilliermondii* son especies menos sensibles a las equinocandinas debido a que en la secuencia de los HS hay cambios en algunos

aminoácidos que podrían determinar la menor susceptibilidad (Katiyar y col., 2006; Garcia-Effron y col., 2008).

La resistencia intrínseca de hongos de algunos géneros y especies de zigomicetos, *Fusarium*, *Scedosporium* y levaduras del grupo de los basidiomicetos como *Cryptococcus*, *Rhodotorula* y *Trichosporon* spp., es una limitación para el uso de antifúngicos del grupo de las equinocandinas en infecciones por estos microorganismos. La pared celular de *C. neoformans* la componen principalmente α -1,3-glucanos o α -1,6-glucanos y aunque en esta levadura se encuentra la β -1,3-glucano sintasa y es inhibida por las equinocandinas, no se conoce porque la enzima produce pocos β -1,3-glucanos y la levadura es resistente a este grupo de antifúngicos (Petrikos y Skiada, 2007; Rogers, 2008; Fera y col., 2009; Johnson y col., 2011).

1.6. Correlación de la actividad antifúngica *in vitro* con la eficacia del tratamiento antifúngico en humanos

Uno de los objetivos de la evaluación de la susceptibilidad antifúngica *in vitro* es la predicción de la respuesta del paciente a un tratamiento determinado. Por ello, la correlación que existe entre la sensibilidad *in vitro* y la respuesta clínica es un área de gran interés en la micología clínica y en la que se precisa todavía de futuras investigaciones.

En general, la eficacia de un tratamiento depende de factores del huésped como el estado inmune, la complejidad de la enfermedad de base, la farmacocinética del medicamento o el lugar de la infección. Otros factores son dependientes del agente infeccioso, como el fenotipo de susceptibilidad *in vitro* y/o la virulencia. Además, factores relacionados con las técnicas de susceptibilidad o la presencia del efecto “trailing” (inhibición parcial del crecimiento en un amplio rango de concentraciones en presencia de algunos azoles, principalmente FCZ), pueden afectar la correlación *in vitro* - *in vivo* (White y col., 1998; Arendrup, 2013).

La correlación *in vitro* - *in vivo* no siempre es obvia y es complicado predecir el resultado del tratamiento en función de la sensibilidad *in vitro*. Existen casos en los que es posible encontrar susceptibilidad *in vitro* con fallo terapéutico o resistencia *in vitro* con respuesta al tratamiento (Perkhofer y col., 2010). *Candida parapsilosis* es una levadura poco virulenta y menos susceptible a las equinocandinas *in vitro* que las demás especies del género. Sin embargo, diferentes estudios han demostrado que la respuesta al tratamiento en pacientes con candidemia por esta levadura no difiere de manera significativa con respecto a los infectados con especies sensibles (Pappas y col., 2007;

Garcia-Effron y col., 2008; Colombo y col., 2010). No obstante, la administración de un antifúngico con alta potencia pueden resultar en fallo terapéutico si la infección está avanzada y el organismo es muy virulento o si el paciente tiene el sistema inmune debilitado (Pappas y col., 2007; Reboli y col., 2007; Arendrup, 2013).

En otras situaciones, la resistencia *in vitro* pronostica fallo terapéutico como sucede con *C. krusei* y *C. glabrata* que son especies poco sensibles a los azoles, y los pacientes infectados con estas especies no responden a tratamientos con estos antifúngicos (Abbas y col., 2000; Pan y col., 2005; Chapeland-Leclerc y col., 2010). En otros estudios, se ha descrito que la resistencia *in vitro* a AmB de aislamientos de *Candida* spp., *A. flavus* y *A. terreus* se correlaciona con la muerte de los pacientes a pesar del tratamiento (Lass-Flörl y col., 1998; Alves y col., 2009; Hadrich y col., 2012).

Todos estos estudios indican que existe una necesidad de establecer una metodología estandarizada de determinación de CMIs *in vitro* y la definición de puntos de corte de relevancia clínica que distingan de manera adecuada las cepas resistentes. En este caso, los modelos animales son una herramienta de gran utilidad, que tal y como se describe a continuación, pueden permitir establecer un sistema controlado para evaluar la eficacia de los antifúngicos *in vivo* frente a distintos hongos y así, poder acercarse a la predicción de la respuesta a estos en el hombre.

1.7. Modelos animales en el estudio de la infección fúngica: Modelos convencionales y no convencionales

Tradicionalmente, animales mamíferos como roedores (ratones, ratas y cobayas) y lagomorfos (conejos), han sido una herramienta útil para el estudio de las enfermedades infecciosas por la susceptibilidad a un rango de infecciones que afectan al hombre. A pesar de las diferencias, estos animales comparten similitudes con el hombre a nivel anatómico y en la respuesta inmune innata y adaptativa (Formal y col., 1966; Hartman y col., 1991; Lipinski y col., 2012; Arikan y col., 2013).

Los hongos han sido objeto de estudio en diferentes modelos animales, siendo los murinos los más empleados. Estos modelos han sido útiles en la identificación de factores de virulencia de los principales hongos de importancia clínica como *A. fumigatus*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, dermatofitos y hongos dimórficos. Asimismo, en modelos animales se han caracterizado diferentes elementos de la respuesta inmune innata y adquirida en la infección con diferentes hongos de importancia clínica. Otro campo en el que los modelos animales han sido importantes es en el estudio de la eficacia, sinergismo, farmacocinética/farmacodinámica y toxicidad antifúngica (van de Sande y

col., 2009; Arendrup y col., 2010; Shimamura y col., 2011; Gazzoni y col., 2012; Livermore y col., 2013).

Los modelos murinos continúan siendo una herramienta muy útil en la micología médica, dado que muchos de los resultados obtenidos con ellos, pueden ser extrapolados al hombre. Sin embargo, su utilización presenta problemas éticos por el dolor que se les suele causar durante los procedimientos. Por esta razón, el uso de modelos animales está regulado legalmente. En la actualidad, los procedimientos animales en España deben ser aprobados por tres comités diferentes: el órgano encargado del bienestar animal del animalario (OEBA), el comité de bioética y de la autoridad competente (en España, la Comunidades Autónomas). Además, la cantidad de animales que se requiere para evaluar colecciones de mutantes con el fin de dilucidar factores de virulencia y actividad de antifúngicos solos o combinados, es logísticamente complejo para manejar y económicamente costoso (Pradel y Ewbank, 2004; Livermore y col., 2013). Por ello, en los últimos años hay interés creciente en la comunidad científica en desarrollar modelos alternativos que puedan paliar, al menos en parte, las limitaciones del uso de animales vertebrados en experimentación. En este sentido, en los últimos años, se han utilizado otros modelos de infección fúngica como huevos embrionados de pollo o *Danio rerio* (pez cebra) (Pradel y Ewbank, 2004; Brothers y col., 2011; Jacobsen y col., 2012) y organismos más simples como los insectos *Drosophila melanogaster*, *Bombyx mori*, *Manduca sexta*, *Galleria mellonella*, el nematodo *Caenorhabditis elegans* y amebas. Estos, además de tener una respuesta inmune innata similar a la de los mamíferos, son fácilmente manipulables en el laboratorio y en algunos casos se dispone del genoma completo y/o colecciones de “knock-outs” (Cotter y col., 2000; Pradel y Ewbank, 2004; Lionakis y Kontoyiannis, 2010; Muhammed y col., 2012). *Drosophila melanogaster*, conocida como la mosca del vinagre, es un insecto genéticamente manipulable, fácil de usar y con un coste de su uso y mantenimiento, significativamente inferior a los modelos con mamíferos. Estas características lo han convertido en una alternativa para la evaluación de la virulencia de hongos de importancia médica así como de la actividad de antifúngicos. Los resultados obtenidos en este modelo han sido similares a los observados en huéspedes murinos (Chamilos y col., 2006; Lionakis y Kontoyiannis, 2012). *Caenorhabditis elegans* es un nematodo también susceptible a la infección fúngica por lo que se ha utilizado en el estudio de factores de virulencia y eficacia antifúngica (Tampakakis y col., 2008).

Galleria mellonella (comúnmente conocida como la polilla de la cera o de la miel) es un lepidóptero en cuyo ciclo de vida los huevos producen larvas que pasan por siete estados, tras lo cual se transforman en pupas de las que emergen las polillas. Las larvas

del último estado larvario se han utilizado con éxito en el estudio de la virulencia de hongos patógenos humanos como *C. neoformans*, *C. albicans*, *A. fumigatus* y *Fusarium* spp. (Brennan y col., 2002; Mylonakis y col., 2005; Coleman y col., 2011; Cheema y Christians, 2011; Garcia-Rodas y col., 2011). La virulencia de mutantes de *C. albicans* en *G. mellonella* se correlaciona con los obtenidos en ratones (Brennan y col., 2002). El modelo se ha utilizado también para estudios de eficacia de antifúngicos de forma individual y en combinación con otras moléculas (Cowen y col., 2009; Kelly y Kavanagh, 2011; Lionakis, 2011). Sin embargo, hay situaciones en las que mutantes avirulentos en ratones son patógenos en *G. mellonella* (Jackson y col., 2009), lo que señala la necesidad de seguir investigando en la validez de estos modelos en la micología clínica.

En comparación con otros modelos no vertebrados, *Galleria mellonella* presenta una serie de ventajas: i) Las larvas pueden mantenerse a diferentes temperaturas (25°C-37°C) lo que permite simular las condiciones del hábitat del hongo y las del humano, ii) El tamaño del inóculo y la dosis del fármaco es más controlable que en otros modelos alternativos, iii) las larvas son fácilmente manipulables por lo que se pueden inocular un alto número en un corto período de tiempo, iv) es posible utilizar diferentes rutas de inoculación (en la hemolinfa o tópica), y v) tienen un tamaño de alrededor 12-20 mm, lo que es suficiente para obtener tejido y hemolinfa para posteriores análisis (Cotter y col., 2000; Fallon y col., 2012). Como otros insectos, la respuesta inmune humoral de *G. mellonella* incluye melanización, producción de péptidos antimicrobianos y coagulación de la hemolinfa (Hoffmann, 1995). La melanina se localiza alrededor de partículas exógenas y conduce a la formación de cápsulas melanóticas que contienen la infección (Kavanagh y Reeves, 2004; Bidla y col., 2009). Además, la hemolinfa de *G. mellonella* tiene diferentes tipos celulares denominados hemocitos a los cuales se les atribuye diferentes funciones, entre ellas, la fagocitosis (Kavanagh y Reeves, 2004; Peleg y col., 2009; Coleman y col., 2011).

Los modelos alternativos, aunque hoy en día no reemplazan el uso de vertebrados, pueden ser útiles en estudios preliminares con el fin de seleccionar cepas, mutantes, medicamentos, moléculas etc, que justifiquen el escalamiento a la experimentación en animales vertebrados en la búsqueda de la identificación de factores relacionados con la virulencia fúngica y/o con la eficacia y toxicidad de fármacos.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El tratamiento de las enfermedades fúngicas invasoras precisa de un conocimiento adecuado de la eficacia de los antifúngicos. Para ello, es necesario profundizar en los mecanismos de acción de estos fármacos tanto *in vitro* como *in vivo*. En este sentido, existen antifúngicos, como es la AmB, de los que todavía se desconoce con exactitud el mecanismo de acción. Además, de la formación de poros en la membrana plasmática, la AmB induce la acumulación de radicales libres, aunque se desconoce la importancia de este mecanismo en la acción fungicida de la molécula.

Por otro lado, la eficacia de los antifúngicos *in vivo* depende de muchos factores, no solo de la sensibilidad del microorganismo al antifúngico, sino también de factores del huésped (sistema inmune) y de la farmacocinética y farmacodinámica del fármaco *in vivo*. Como se mencionó anteriormente, el uso de animales para este propósito presenta una serie de problemas, unos de naturaleza ética, como son el número de animales a utilizar y el dolor al que se somete a los mismos, y otros de naturaleza económica como son el coste de los animales y de su mantenimiento. Por ello, se hace necesario el desarrollo de modelos alternativos que permitan evaluar la eficacia de los antifúngicos *in vivo*.

Por estas razones, en este trabajo nos hemos propuesto profundizar en estas dos áreas con los siguientes objetivos concretos:

- 2.1. Estudiar el papel del estrés oxidativo en el mecanismo de acción de la AmB.
- 2.2. Evaluar el mecanismo de resistencia cruzada entre AmB y azoles.
- 2.3. Estandarizar un modelo alternativo de infección fúngica para el estudio de virulencia y eficacia de fármacos antifúngicos.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Cepas

3.1.1. Levaduras

Las levaduras incluidas en el trabajo proceden de muestras clínicas pertenecientes a la colección del Servicio de Micología del Centro Nacional de Microbiología (CNM-CM) del Instituto de Salud Carlos III. Además se incluyeron algunas cepas ATCC (Tabla 3.1). La identificación a nivel de especie se realizó por métodos bioquímicos, morfológicos y por secuenciación del fragmento ITS1-5.8s-ITS2 del ADN ribosómico (White y col., 1990).

3.1.2. *Aspergillus* spp.

En este trabajo se utilizaron seis cepas de *Aspergillus* spp. De la colección de hongos miceliales del Servicio de Micología del Centro Nacional de Microbiología (CNM-CM) del Instituto de Salud Carlos III: tres cepas salvajes de *A. fumigatus* susceptibles a todos los antifúngicos de uso clínico (CM-237, akuB^{KU80} y CBS144.89) (<http://www.aspergillusgenome.org/Strains.shtml#fumigatus>) dos *A. lentulus* (CM-1290 y CM-4415) resistentes a los azoles y AmB y dos *A. terreus* (CM-3951 y CM-4080) con sensibilidad variable a AmB. Todas las cepas fueron identificadas por la amplificación y secuenciación de un fragmento del gen de la β -tubulina de acuerdo a la metodología previamente descrita (Alcazar-Fuoli y col., 2008).

3.2. Técnicas microbiológicas

3.2.1. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

Las levaduras se cultivaron en medios líquidos como Sabouraud (Oxoid, Reino Unido) o Yeast Peptone Dextrose (YPD). Además, se utilizó el medio mínimo Yeast Nitrogen Base (YNB) (Becton Dickinson and Company, Diagnostic Systems, Sparks, MD, USA) suplementado con glucosa 2% o con glicerol (3%)-etanol (2%) como fuente de carbono fermentable y respiratorias, respectivamente. Para los medios sólidos, se añadió agar bacteriológico N°1 (Oxoid) a una concentración de 1,5%.

Tabla 3.1. Cepas de *Candida* spp. y *Cryptococcus* spp. origen y susceptibilidad

Especie	Código	Azoles	AmB	Origen/Referencia
<i>C. albicans</i>	CL-8752	S	S	Servicio Micología
	CL-8756	S	S	Servicio Micología
	SC 5314	S	S	Servicio Micología
	CL-8790	S	S	Gillum y col. (1984)
	CL-8191	S	S	Servicio Micología
<i>C. parapsilosis</i>	CL-8717	S	S	Servicio Micología
	ATCC 22019	S	S	Rudek (1978)
	CL-8722	S	S	Servicio Micología
	CL-8708	S	S	Servicio Micología
	CL-8707	S	R	Servicio Micología
	CL-7784	S	S	Servicio Micología
<i>C. tropicalis</i>	CL-8698	S	S	Servicio Micología
	CL-8715	S	S	Servicio Micología
	CL-8796	S	S	Servicio Micología
	CL-8747	S	S	Servicio Micología
	CL-8759	S	S	Servicio Micología
	ATCC 750	S	S	Castellani (1910.)
	ATCC 200956	R	R	Rex y col. (1995)
	CL-6835	R	R	Servicio Micología
	CL-7099	S	S	Servicio Micología
	CL-7119	S	S	Servicio Micología
	CL-7868	S	S	Servicio Micología
	CL-7869	S	S	Servicio Micología
	TP- 13650	R	S	Servicio Micología
<i>C. neoformans</i>	CL-4021	S	S	Servicio Micología
	CL-5707	S	S	Servicio Micología
	B3501	S	S	Kwon-Chung (1976)
	ATCC 24067	S	S	ATCC
<i>C. gattii</i>	H99 (ATCC 20882)	S	S	Perfect y col. (1980)
	CBS-10514 (R265)	S	S	Kidd y col. (2004)
	NIH-191	S	S	NIH, USA
	NIH-198	S	S	NIH, USA
	CBS-10865	S	S	Kidd y col. (2004)
<i>C. haemulonii</i>	NIH-34	S	S	NIH, USA
	CL-4640	S	S	Servicio Micología
	CL-4641	S	S	Servicio Micología
	CL-6915	S	S	Servicio Micología
	CL-7829	S	S	Servicio Micología
<i>C. krusei</i>	CL-9175	S	S	Servicio Micología
	CL-8059	R	S	Servicio Micología
	CL-8076	R	S	Servicio Micología
	CL-8197	R	S	Servicio Micología
	CL-8285	R	S	Servicio Micología
	ATCC-6258	R	S	Rudek (1978)
	CL-8698	R	S	Servicio Micología
<i>C. glabrata</i>	CL-8827	R	S	Servicio Micología
	CL-8164	S	S	Servicio Micología
	CL-8754	S	S	Servicio Micología
	CL-8753	S	S	Servicio Micología
	CL-7943*	S	R	Servicio Micología
	CL-8196	S	S	Servicio Micología
	CL-8754	S	S	Servicio Micología

S; sensible, R; resistente. AmB; anfotericina B.

Para el recuento de unidades formadoras de colonias (UFCs) a partir de larvas infectadas, se preparó Sabouraud sólido con cloranfenicol (0,15 mg/mL) (Oxoid). Las

levaduras se cultivaron de forma habitual a 30°C con agitación constante a 150 rpm durante 18 h. Los inóculos se obtuvieron por centrifugación a 2.500 rpm (3.000 g) en una centrífuga Hermle z400K y posterior lavado, dos veces, con PBS estéril. En algunas ocasiones, los cultivos se incubaron a 35°C ó 37°C durante 48 h. Para evaluar la estabilidad de la pared celular se utilizó Sabouraud sólido con diferentes concentraciones de rojo Congo (200, 150, 100 ó 50 µg/mL).

Los hongos filamentosos se cultivaron en Agar Patata Dextrosa (APD) y Sabouraud (2% glucosa, 1% peptona; Oxoid, Madrid). El APD favorece el crecimiento y la esporulación rápida de *A. fumigatus* por lo que se ha utilizado para obtener conidias en altas concentraciones.

Las cepas de *Aspergillus* spp. se incubaron a 37°C durante 72 h. Las conidias se recogieron añadiendo 5 mL de Tween 20 (0,1%) estéril directamente al tubo de APD. En caso de la presencia de hifas en las suspensiones, las muestras se pasaron a través de filtros de 11 µm (Millipore).

La masa micelial necesaria para la extracción de esteroides se obtuvo de cultivos en el medio mínimo (MM) de composición: Tartrato amónico (1% a partir de una solución 0,5 M), 1% glucosa, 2% sales de *Aspergillus* (50X)*, 1 M sorbitol y ¹solución de elementos traza. Una vez preparado el medio, el pH se ajustó a 6,5 con 10 M NaOH. El medio MM sólido se obtuvo añadiendo 1% de agar bacteriológico N° 1 (Oxoid).

***Sales de *Aspergillus* (50X):**

2,6% KCl, 2,6% MgSO₄·7H₂O, 7,6% KH₂PO₄, 5% solución elementos trazas (20x)¹.

¹Solución de elementos traza (20X):

2% ZnSO₄·7H₂O; 1,1% H₃BO₃; 0,5% MgCl₂·4H₂O; 0,5% FeSO₄·7H₂O; 0,16% CoCl₂·6H₂O; 0,16% CuSO₄·5H₂O; 0,11% (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O; 6% Na₄ EDTA·4H₂O.

Las sales se fueron agregando de forma sucesiva al agua destilada sin adicionar la siguiente antes de disolver la anterior. La solución resultante se enrasó hasta alcanzar el volumen final y se esterilizó en autoclave.

3.2.2. Ensayos de sensibilidad antifúngica *in vitro*

3.2.2.1. Microdilución en caldo

3.2.2.1.1. Antifúngicos

En este trabajo se utilizaron los siguientes antifúngicos: anfotericina B (AmB, Sigma Aldrich Química), fluconazol (FCZ) y voriconazol (VCZ; Pfizer S.A., Madrid), itraconazol (ITZ; Janssen Pharmaceutica, Madrid) y anidulafungina (ANF; Merck & Com, Inc, NJ, USA). Todos los antifúngicos fueron obtenidos como polvo estándar de los respectivos fabricantes y disueltos en dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma) con la excepción del FCZ que se disolvió en agua destilada estéril. Una vez preparados, los antifúngicos se conservaron a - 80°C hasta su uso.

3.2.2.1.2. .Determinación de la susceptibilidad antifúngica en levaduras

La concentración mínima inhibitoria (CMI) de AmB así como de los azoles (FCZ, ITZ y VCZ) y ANF de las diferentes cepas, se determinó siguiendo el protocolo del European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (http://www.eucast.org/organization/subcommittees/eucast_afst; EUCAST-AFST). En este método, se emplea el medio de RPMI, tamponado a pH 7,0 con ácido 3-(n-morfolino) propanosulfónico (MOPS), en una concentración final de 165 mM, suplementado con glucosa al 2% (Arendrup y col., 2012). Las diferentes concentraciones de los antifúngicos (2X) se depositaron en placas de 96 pocillos para ser inoculadas posteriormente con $1-5 \times 10^5$ levaduras/mL (2X) preparadas en agua para lograr un inóculo final de $0,5-2,5 \times 10^5$ levaduras/mL así como concentraciones 1X de los antifúngicos.

Las CMIs se definieron en la concentración a la que se observó una reducción del 50% de crecimiento para los azoles y las equinocandinas, respecto al control de crecimiento tras 24 h de incubación a 35°C. Para la AmB se consideró una reducción del crecimiento \geq al 90%. El perfil de sensibilidad se definió según los puntos de corte publicado por el EUCAST-AFST: AmB (resistente > 1 $\mu\text{g/mL}$), FCZ (resistente > 4 $\mu\text{g/mL}$) y para VCZ (resistente > 0,125 $\mu\text{g/mL}$). Las cepas *C. krusei* ATCC 6258 y *C. parapsilosis* ATCC 22019 se incluyeron como control de la técnica.

3.2.2.1.3. Determinación de susceptibilidad de *Aspergillus* spp

La sensibilidad de las especies de *Aspergillus* se determinó siguiendo el protocolo AFST-EUCAST para hongos filamentosos.

El inóculo se obtuvo por separación de las conidias de la superficie de cultivos esporulados, previamente incubados a 37°C, por adición de PBS-Tween 0,1%. La concentración de la suspensión de conidias se estimó tras recuento en un hemocitómetro y el inóculo se ajustó a $2-5 \times 10^6$ conidias/mL. Posteriormente se diluyó 1:10 ($2-5 \times 10^5$ conidias/mL) para obtener un inóculo final entre $1-2,5 \times 10^5$ conidias/mL al ser añadido a las placas que contienen las diferentes concentraciones de los antifúngicos (2X). Las CMI se determinaron visualmente tras 24-48 h a 37°C usando un espejo. El valor de la CMI correspondió a la concentración más baja del antifúngico que inhibió el crecimiento. El perfil de susceptibilidad se definió de acuerdo a los puntos de corte epidemiológicos publicados en (http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/). Para los tres antifúngicos (ITZ, VCZ y AmB) valores de CMI > 2 µg/mL se consideraron resistentes. Las pruebas de susceptibilidad se realizaron al menos dos veces en diferentes días. Con algunas cepas se evaluó la susceptibilidad antifúngica usando el método E-test tal como se describió para levaduras usando una concentración de inóculo de 10^5 conidias/mL.

3.2.3. Curvas de crecimiento

Para evaluar diferencias en el crecimiento, las cepas se pre-inocularon en Sabouraud líquido y se incubaron una noche a 30°C. La densidad del pre-inoculo se cuantificó utilizando un hemocitómetro. El inóculo (10^5 levaduras/mL) se preparó en el medio YNB suplementado con glucosa 2% o con glicerol (3%)-etanol (2%) como fuente de carbono fermentable y no fermentable (respiratoria), respectivamente. Ciento cincuenta µL de esta suspensión fueron depositados por triplicado en placas de 96 pocillos que se incubaron a 35°C, sin agitación, en un espectrofotómetro Labsystems IEMS Reader MF. La densidad óptica (D.O.) se registró cada hora, durante 48 h a 540 nm. Además, se hicieron curvas de crecimiento de Sabouraud de varias cepas de *C. tropicalis* a 30 y 37°C para evaluar si había diferencias en el crecimiento de acuerdo a la temperatura. Los resultados se representaron gráficamente (D.O. vs Tiempo) y se calculó el tiempo de generación en los medios con fuentes de carbono fermentables y respiratorias.

3.2.4. Microscopía electrónica de transmisión

Para el estudio de la estructura de las levaduras por microscopía electrónica de transmisión (MET), se utilizó un cultivo en fase exponencial del crecimiento en medio Sabouraud líquido del cual se tomaron 15 mL a una concentración de 3×10^8 células/mL. Tras centrifugar las células a 2.000 rpm (3.000 g) en una centrífuga Hermle z400k durante 3 min, se resuspendieron y fijaron durante 2 h a 4°C en 2% glutaraldehído,

4% paraformaldehído tamponado con Na_2HPO_4 (0,1 M, pH 7,4). Seguidamente se centrifugó y se lavó 3 veces con Na_2HPO_4 (0,1 M, pH 7,4), tras lo cual se resuspendió en 1 mL de 1% permanganato potásico (en agua) y se incubó 1 h a 4°C. Posteriormente se añadió 1 mL de 0,15% de ácido tánico en tampón Na_2HPO_4 (0,1 M pH 7,4) durante 1 min, se centrifugó y se agregó 1 mL de 2% acetato de uranilo durante 1 h a temperatura ambiente. Las muestras fueron deshidratadas con concentraciones crecientes de etanol (50, 75, 90, 95 y 100%) durante 10 min a 4°C. Finalmente se trataron con concentraciones crecientes (25, 50, 75, 100%) de resina epoxi y polimerizadas en cápsulas de base piramidal a 60°C durante 48 h. Los sedimentos de células incluidos se pulieron con cuchillas de vidrio y se obtuvieron secciones ultrafinas (50-70 nm) con una cuchilla de filo de diamante con 45° de inclinación en un ultramicrotomo RMC MT6000_XL (RMC Inc.). Finalmente los cortes se depositaron en rejillas de cobre recubiertas con resina Formvar. Los cortes se tiñeron con acetato de uranilo saturado en condiciones de humedad y con 2% citrato de plomo. Para la visualización de las muestras se empleó un microscopio electrónico de transmisión (MET) TECNAI 12 (FEI) estabilizado a 120 kV y se registraron imágenes captadas con una cámara CCD (Charged Coupled Device) Gatan 1k a una magnificación entre 3.000X y 15.000X para observar la morfología de las levaduras y medir su tamaño, de las mitocondrias, el ancho de la pared, el volumen mitocondrial y realizar el recuento del número de mitocondrias por plano captado. El volumen de cada levadura y de las mitocondrias, se calculó aplicando la fórmula para determinar el volumen de estructuras elipsoidales ($V = \pi/6 \times b^2 \times a$) donde **b** es el largo y **a** el ancho de la organela (Sun y Liu, 2003). Además se midió el ancho de la pared de mínimo 20 levaduras por cepa y se calculó el volumen de la pared con respecto al de la levadura.

3.2.5. Detección de β -1,3-glucanos por inmunofluorescencia

El contenido de β -1,3-glucanos en la pared celular en levaduras de las diferentes cepas de *C. tropicalis*, se evaluó por inmunofluorescencia indirecta. Para ello las células se incubaron en un baño a 99°C durante 30 min con el fin de lograr la exposición de los polisacáridos para ser detectados con el anticuerpo ya que estos se encuentran localizados por debajo de la capa proteica por lo que en condiciones normales no están accesibles a los anticuerpos. Seguidamente, las células se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 40 min a temperatura ambiente y lavadas tres veces con PBS. A continuación las células se suspendieron en PBS con suero bovino fetal (SFB, HyClone-Perbio) al 1% durante 30 min a 37°C. Posteriormente se agregaron 200 μL de un anticuerpo monoclonal IgG de ratón (β -1-3 *glucan antibody*, Biosupplies Australia Pty Ltd, Bundoora

Victoria, Australia) (1:200) disuelto en SFB y se incubó 1h a 37°C. Tras lavados (X3) con PBS, se agregaron 200 µL del anticuerpo secundario a 10 µg/mL (Alexa Fluor® 488 Goat anti Mouse IgG) y se incubó 1h a 37°C en oscuridad. Finalmente las muestras se lavaron con PBS y se visualizaron con un microscopio de fluorescencia Leica DMI 3000B. Las muestras además fueron analizadas en un citómetro para la detección de la intensidad media de fluorescencia (IMF) emitida por el anticuerpo marcado con Alexa Fluor® 488 (fluorescencia verde en el canal FL1. La IMF fue analizada con el software FlowJo 7.1.6 (Tree star Inc OR, USA, ver detalles de la metodología en la sección 3.3.1).

3.3. Estrés oxidativo en respuesta al tratamiento con anfotericina B

3.3.1. Detección de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Para la determinación de la producción endógena de ROS las levaduras se cultivaron en Sabouraud líquido como se ha descrito previamente. Se prepararon suspensiones de levaduras a una concentración de 10^7 levaduras/mL (2X) en PBS y 0,5 mL se trataron con el mismo volumen de soluciones de diferentes concentraciones de AmB (2X) en PBS partiendo de una solución inicial de 3.200 µg/mL en DMSO para lograr concentraciones finales de 0,25, 1, 2 ó 8 µg/mL. Posteriormente se incubaron a 37°C durante 1 y 3 h. En paralelo, se incluyeron células tratadas con H₂O₂ (2,5 ó 5 mM) y sin tratar, como controles positivos y negativos, respectivamente. En el caso de *Aspergillus*, las conidias se obtuvieron como se describió para las pruebas de susceptibilidad. El inóculo se ajustó a 10^7 conidias/mL (2X) como se ha descrito para las levaduras. En este caso las concentraciones finales de AmB fueron: 0,06, 0,5, 2 ó 8 µg/mL. Las muestras se incubaron durante 3 h a 37°C. Para detectar la producción de radicales libres, se agregó diacetato de dihidrofluoresceína (DHF; 40 µM, Sigma Aldrich) durante 30 min en oscuridad a la misma temperatura. La DHF difunde a través de las membranas celulares y es hidrolizada por las esterasas a un compuesto no fluorescente que es rápidamente oxidado por las especies reactivas de oxígeno (ROS) convirtiéndose en una molécula fluorescente (Hempel y col., 1999). De ésta manera se puede visualizar con un microscopio de fluorescencia o cuantificar mediante citometría de flujo. En nuestro caso, tras la incubación, se analizó la fluorescencia emitida por cada cepa y por su respectivo control con la ayuda de un citómetro de flujo FACSCalibur cytometer (BD Biosciences) en el canal FL1 en 10.000 eventos contados. Los datos fueron obtenidos con el software Cell quest Pro (versión 4.0.2, BD Biosciences) y posteriormente procesados con el software FlowJo 7.1.6 (Tree star Inc OR, USA). El porcentaje de células positivas se obtuvo restando las células fluorescentes del control negativo del total de las células tratadas en cada muestra. Los experimentos se realizaron al menos dos veces en

diferentes días. Los resultados se expresaron como la MD \pm DE del porcentaje de células positivas para la producción de ROS en los diferentes experimentos. Además se calculó la intensidad media de fluorescencia (IMF).

3.3.2. Efecto de la anfotericina B sobre las proteínas

3.3.2.1. Extracción de proteínas

Para evaluar el daño oxidativo acumulado en las células, se detectó la carbonilación de las proteínas mediante la técnica de Western blot. Las cepas se cultivaron y se trataron con AmB (2 μ g/mL) o H₂O₂ (2,5 mM ó 5 mM) durante 1, 3 y 6 h según se describe en el apartado anterior. Posteriormente, las células se lavaron con agua fría y se conservaron a -80°C hasta su utilización. Para obtener las proteínas, se añadieron bolas de vidrio lavadas con ácido (425-600 μ m; Sigma), en una cantidad aproximada a la del volumen ocupado por las células. y un tampón de lisis (25 mM de imidazol-HCL-2 mM EDTA) suplementado con un mezclado de inhibidores de proteasas (Complete Protease inhibitor tablets, Roche, Indianapolis). La ruptura mecánica se llevó a cabo con cuatro ciclos de agitación vigorosa durante 20 s cada uno a la máxima velocidad en un homogenizador Fast Prep 24 (MP Biomedicals), alternados con periodos iguales de permanencia de la muestra en hielo. Finalmente, la mezcla se centrifugó a 12.000 rpm (13.800 g) durante dos min en una microcentrífuga Biofuge Fresco (Heraeus) y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo para determinar la concentración de proteínas según método de Bradford (Bradford, 1976) usando el kit Protein Assay (BioRad, München, Alemania). Seguidamente, se tomaron 100 μ g de proteína y se desnaturalizaron, mediante la adición de SDS a una concentración final de 24% en un volumen de reacción de 100 μ L, incubando por incubación a 100°C durante 3 min.

3.3.2.2. Derivación del grupo carbonilo y Western blot

3.3.2.2.1. Tratamiento de proteínas y separación

Para la detección del grupo carbonilo se siguió el protocolo publicado por Molina y col (2004). A las proteínas desnaturalizadas (100 μ L) se añadieron 50 μ L de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNTP, Sigma) a partir de una solución stock de 10 mM en ácido trifluoroacético (TFA) para formar 2,4- dinitrofenilhidrazona tras la reacción con los grupos carbonilo. La reacción se llevó a cabo a 25°C durante 10 min. Seguidamente, se agregó una mezcla de Tris 2M, glicerol 30% y β -mercaptoetanol para detener la reacción. Para los ensayos de Western blot, 15 μ L (10 μ g de proteína) de cada muestras se separaron por SDS-PAGE usando geles de acrilamida/bisacrilamida (30%) (Biorad) de 8 cm (ancho)

x 7.3 cm (alto) en un sistema Mini-PROTEAN® 3 Cell (BioRad, Hercules, CA, EEUU), sometidas a una corriente de 20 mA durante 1 h.

3.3.2.2. Detección de los grupos carbonilo por Western blot

Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa durante 1 h a 400 mA usando el dispositivo Mini Trans-Blot® (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU) con un sistema tipo "sándwich" en el cual la membrana quedó entre dos esponjas absorbentes y papel de filtro, embebido en el tampón de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%, agua desionizada). Tras la transferencia, las membranas se bloquearon con 50 mL del tampón B (2,5 gr de leche descremada disuelta en TBST (2 M Tris-HCl, 2,5 M NaCl y 0,1% de Tween 20) durante una noche en agitación constante a 4°C. Las membranas se lavaron tres veces en 70 mL de TBST en constante agitación durante 15 min cada uno.

Las hidrazonas (2,4-dinitrofenilhidrazona), se detectaron tras la adición de un anticuerpo monoclonal anti-DNP (Sigma; 1:2,500) disuelto en 50 mL de tampón (5 mL tampón B en 100 mL TBST) durante 1h en constante agitación a 50 rpm a temperatura ambiente. A continuación, se realizaron tres lavados, tal y como se ha descrito anteriormente, y se agregó un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rábano (1:10.000, *HRP-conjugated goat anti-rabbit*, Amersham) disuelto en TBST, durante 30 min en constante agitación. Las membranas se lavaron con TBST por periodos de 15, 10 y 5 min (tres lavados) con TBST para eliminar el exceso de anticuerpo. Seguidamente las membranas se colocaron sobre un trozo de Parafilm®M. La detección de las bandas se llevó a cabo cubriendo la membrana con 1 mL del sustrato quimioluminiscente (Millipore Immobilon) y con otro trozo de Parafilm®M para facilitar la distribución homogénea del sustrato. Tras 5 min de reacción a temperatura ambiente, la señal quimioluminiscente se detectó y cuantificó utilizando un escáner Ultrasignal (Pierce) usando el software LumiAnalyst (Lumi-Analyst software; Roche, Mannheim, Germany) tras ocho min de exposición de las membranas.

Finalmente, para confirmar la homogeneidad en la carga de las muestras, las membranas fueron teñidas con azul de Coomassie 0,1% (preparado en isopropanol 25% y ácido acético glacial 10%) durante 40 min en agitación constante a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionó una solución decolorante (isopropanol 10% y ácido acético 10%) y de agitó nuevamente durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, se dejó secar la membrana sobre un papel absorbente y se captó la imagen como se describió previamente.

Las imágenes de la quimioluminiscencia y las de la tinción con Coomassie fueron analizadas con el software ImageJ (National Institute of Health, <http://rsb.info.nih.gov/ij>). Se seleccionaron tres áreas representativas de cada muestra y se calculó la intensidad de las bandas con la opción "Plot Profile".

Para comparar el grado de carbonilación entre las muestras, se dividió la intensidad de las áreas seleccionadas de las proteínas carboniladas entre la intensidad de las respectivas áreas teñidas con azul de Coomassie. Los resultados se expresaron como el porcentaje de la intensidad relativa de cada muestra comparando con la muestras control (sin tratamiento) al que se le asignó arbitrariamente un valor de 100.

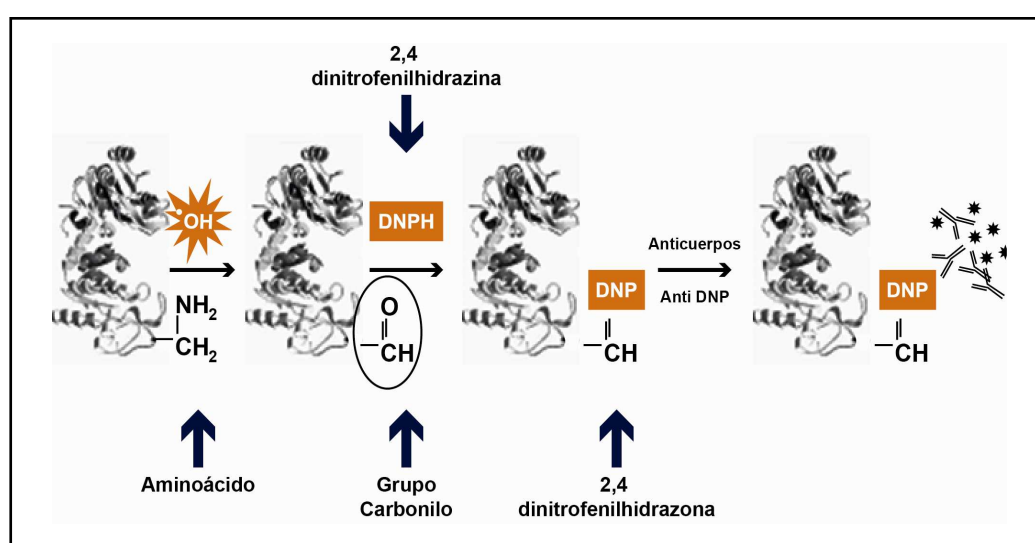


Figura 3.1. Representación de la estrategia de detección de grupos carbonilo en las proteínas. El efecto de las ROS sobre las proteínas da origen a grupos carbonilo. Estos grupos reaccionan con la 2,4 dinitrofenilhidrazina y forman el compuesto estable 2,4 dinitrofenilhidrazona que puede ser detectado con un anticuerpo específico. Figura modificada de Irazusta y col. (2008).

3.3.3. Efecto de la rotenona sobre la producción de ROS en presencia de anfotericina B

3.3.3.1. Estandarización del efecto de la rotenona sobre la producción de ROS y la viabilidad de *C. tropicalis* tras el tratamiento con anfotericina B

Inicialmente se realizó una curva de crecimiento de la cepa *C. tropicalis* ATCC 750 en presencia de diferentes concentraciones de rotenona (Sigma). Se partió de una solución stock 100 mM disuelta en DMSO (100%). A partir de esta se prepararon soluciones de trabajo 2X desde 5 mM a 0,312 mM en H₂O destilada estéril. En paralelo se hicieron controles que contenían las respectivas concentraciones de DMSO (5%- 0,312%) para descartar efectos del solvente sobre el crecimiento. Las levaduras se cultivaron en Sabouraud líquido durante una noche a 30°C y se preparó una suspensión

a una concentración de $1-5 \times 10^5$ levaduras/mL en el mismo medio. Para las curvas de crecimiento, se dispensaron 100 μ L de cada concentración de rotenona en placas de 96 pocillos (por triplicado) o del respectivo control de DMSO. A continuación, se adicionó el mismo volumen del inóculo, quedando la concentración de levaduras en el pocillo entre $0,5 - 2,5 \times 10^5$ células/mL. La placa se incubó a 35°C en un espectrofotómetro Labsystems IEMS Reader MF. La densidad óptica (D.O) se registró cada h, durante 48 h a 530 nm. Los resultados se presentaron gráficamente (D.O. vs tiempo h). En aquellos casos en los que se observó inhibición del crecimiento, se comprobó la viabilidad de las levaduras. Para ello, tras realizar la curva de crecimiento, se tomaron 7 μ L de los pocillos en los que se observó inhibición de crecimiento y se cultivaron en placas de Sabouraud. Tras 48 h de incubación, se definió el efecto como fungistático o fungicida según se observó crecimiento o no en las placas, respectivamente.

3.3.3.2. Detección de la producción de ROS en presencia de rotenona y de anfotericina B

Para evaluar el efecto de rotenona sobre la producción de ROS en presencia de AmB, se seleccionaron concentraciones que produjeron inhibición del crecimiento celular sin causar muerte celular. De las concentraciones seleccionadas (0,156, 0,312, 0,625 mM), se prepararon 500 μ L en H₂O destilada estéril a una concentración 2X a partir de una solución stock 100 mM en DMSO. A este volumen se adicionó el mismo volumen de inóculo (2X) preparados en PBS. Las muestras se incubaron durante 1 h a 37°C. Al cabo de este tiempo, se adicionó AmB (0,5, 1 ó 2 μ g/mL) a partir de solución madre preparada en DMSO a 800 μ g/mL y se incubó nuevamente durante 1 h. Seguidamente, se tomaron muestras de cada tratamiento y se realizaron cuatro diluciones seriadas (1:10) de cada una y se cultivaron 7 μ L en placas de Sabouraud para confirmar la viabilidad de las levaduras. Finalmente, a las muestras se agregó DHF, tal y como se ha indicado anteriormente y se determinó la producción de ROS mediante citometría de flujo. Como control se incluyeron células no tratadas con rotenona. Los datos se obtuvieron, se representaron gráficamente con histogramas y se analizaron como se ha descrito en el apartado (3.3.1).

3.3.4. Evaluación del efecto del antioxidante L-cisteína sobre la producción de ROS y la viabilidad en presencia de anfotericina B

Suspensiones de levaduras (5×10^6 células/mL) en PBS se trataron con L-cisteína (Sigma) a las concentraciones de 20, 40 ó 80 mM disuelta en agua y filtrada a través de una membrana con un tamaño de poro de 0,22 μ m (Millipore). Las muestras se

incubaron durante 1 h a 37°C. Seguidamente se adicionó a cada muestra AmB a 0,5, 1 ó 2 µg/mL, a partir de una solución stock del antifúngico en DMSO de 800 µg/mL, y nuevamente se incubaron durante 1 h a 37°C. Tras esta incubación, se tomaron muestras para realizar diluciones seriadas de cada muestra y se cultivar 7 µL de cada una, en placas de Sabouraud. Seguidamente, las las muestra de incubaron con DHF para determinar la producción de ROS como se ha descrito en la sección 3.3.1. Como control se incluyeron células sin ningún tratamiento.

3.3.5. Determinación de la actividad catalasa

3.3.5.1. Obtención de extractos libres de células

Para el medir la actividad catalasa, se inocularon las levaduras en YPD líquido, y se incubó durante un noche a 30°C en agitación. Al día siguiente, se ajustó un nuevo cultivo en YPD a una concentración de células de 2×10^6 levaduras/mL y se incubó nuevamente a 30°C durante aproximadamente 4 h hasta lograr una concentración celular de 10^7 células/mL (fase logarítmica). Las células se centrifugaron a 2.500 rpm (3.000 g) en una centrifuga Hermle z400K, se lavaron con H₂O estéril fría y se eliminó el exceso de agua con una bomba de vacío. Las células se resuspendieron en 1,25 mL de tampón ácido 2 - morfolinoetanosulfónico (MES) 100 mM a pH 6,0, al que se añadió fluoruro de fenilmetil sulfonilo (PMSF) 0,1 mM y cisteína 5 mM. El PMSF y la cisteína se añadieron para estabilizar proteínas de bajo peso molecular e inhibir la actividad de proteasas. A continuación, se procedió a la rotura mecánica con 0,5 g de bolas Ballotini (0,45 mm de diámetro, Sartorius) en tubos de hemólisis (0,5 cm de diámetro) mediante 6 ciclos de rotura en vórtex de 45 s cada uno, alternando con permanencia de las muestras en hielo durante 1 min entre ciclo y ciclo para proteger las muestras de la desnaturalización. Las muestras fueron transferidas a tubos Eppendorff que se mantuvieron en hielo. Los extractos se centrifugaron en una microcentrífuga refrigerada (MSE) a 13.000 rpm (10.000 g) durante 7 min a 4°C, se tomaron los sobrenadantes y se filtraron con columnas de Sephadex G-25 (Amersham, Biosciencias), previamente equilibradas con tampón fosfato potásico (50 mM) a pH 7,8. Finalmente, la concentración de proteína se determinó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976).

3.3.5.2. Evaluación de la actividad enzimática

Para la determinación de la actividad de la catalasa, se empleó el método espectrofotométrico descrito por Aebi (1984), basado en la detección de la disminución de la absorbancia a 240 nm (Abs_{240nm}), originada por la conversión de H₂O₂ a 2 H₂O + O₂. El ensayo se efectuó a 25°C en un espectrofotómetro Shimadzu modelo UV-1203

equipado con un accesorio de termostatación y empleando 1,475 mL de una mezcla de reacción que contenía H_2O_2 10,6 mM en tampón fosfato potásico (50 mM) a pH 7,0. La reacción se inició por la adición de 25 μL de muestra. El registro se efectuó midiendo cada muestra frente a un blanco compuesto por el mismo tampón sin H_2O_2 . La actividad enzimática, expresada en micromoles $\times \text{min}^{-1} \times \text{mg}$ de proteínas $^{-1}$, se estimó calculando la disminución de absorbancia a 240 nm por min, estimando que el coeficiente de extinción molar del H_2O_2 es $39,58 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

3.3.6. Evaluación del potencial de membrana mitocondrial

El potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi\text{m}$) se evaluó usando las sondas rodamina 123 (Invitrogene) y MitoTracker Green (Invitrogene) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las levaduras se cultivaron en Sabouraud líquido como se describió previamente. Para los ensayos, se preparó un inóculo de 10^7 células/mL. A 500 μL del inóculo preparado en un tampón 50 mM de citrato de sodio y glucosa al 2% se agregó Rodamina 123 a una concentración final de 35 μM . El MitoTracker green se utilizó a una concentración final de 50 nM usando la misma concentración de células suspendidas en HEPES (10 mM, pH 7.4) suplementado con 5% de glucosa. En ambos casos, las muestras se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente y protegidas de la luz. Seguidamente, se analizó la fluorescencia de 10.000 células en un citómetro de flujo (FACSCalibur BD) en el canal FL1 y FL2 para el MitoTracker Green y la rodamina 123, respectivamente, usando el software Cell quest Pro (versión 4.0.2, BD). En paralelo, se midió la intensidad de fluorescencia emitida por células sin teñir como control. Los datos fueron procesados usando el software FlowJo 7.1.6 (Tree star Inc OR, USA). La IMF de las células control fue sustraída de las células tratadas con las sondas. Los resultados se expresaron como IMF \pm DE (desviación estándar).

3.4. Mecanismos de resistencia a antifúngicos

3.4.1. Obtención de esteroides

Los esteroides de la membrana celular se extrajeron de acuerdo con el protocolo descrito por (Arthington-Skaggs y col., 2000; Alcazar-Fuoli y col., 2008). Las células se obtuvieron a partir de cultivos en Sabouraud líquido para levaduras y del medio mínimo líquido para *Aspergillus* spp. incubados a 37°C en agitación a 150 rpm durante 18 h. Las levaduras se recolectaron por centrifugación a 2.500 rpm (3.500 g) en una centrífuga Hermle z400k y los micelios por filtración en papel Whatman. Las masas fúngicas se lavaron con agua destilada estéril fría y posteriormente se liofilizaron. Aproximadamente 150-200 mg del peso seco se saponificaron suspendiendo las células en 3 mL de una

solución alcohólica (3:2 metanol:etanol) de hidróxido de potasio al 25%. La solución se agitó con la ayuda de un vórtex durante 1 min y se incubó durante 1 h a 85°C en un baño con agua. Posteriormente se agregó 1 mL de agua y 3 mL de hexano, la mezcla fue agitada vigorosamente durante 3 min en un vórtex. La capa superior (hexano) se transfirió a un tubo de vidrio limpio y se evaporó al vacío (UniEquip UNIJET II Refrigerated Aspirator Vacuum Pump) en una campana extractora de gases. A cada muestra se le agregaron 100 µg de androstanol (Sigma) como un estándar interno para la recuperación y cuantificación de los esteroides. Los esteroides fueron convertidos al respectivo trimetil éster por medio de una reacción con una solución de N, O-bis-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (85°C, 60 min). Las muestras se disolvieron en tolueno.

Las fracciones lipídicas neutras se analizaron con un cromatógrafo de gases Trace (CG) acoplada a un Espectrómetro de Masas (EM) cuadrupolo Trace MS (Thermo, Manchester, UK) (11254746).

3.4.2. Identificación de esteroides

La identificación de cada esteroide se basó en la comparación del espectro de masas y el tiempo de retención de acuerdo con datos obtenidos previamente (Mejanelle y col., 2001; Alcazar-Fuoli y col., 2008). La cantidad de cada esteroide (µg), relativo al peso seco (g de peso seco del hongo) se calculó a partir de tres muestras biológicas (de cada cepa) que fueron analizadas en un cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas (GC-MS). La composición relativa de los esteroides se expresó como la relación entre la concentración individual de los esteroides con respecto al total del contenido de esteroides.

3.4.3. Amplificación y secuenciación de los genes *ERG11* y *ERG3*

3.4.3.1. Iniciadores

Los genes *ERG11* y *ERG3* fueron amplificados y secuenciados usando los iniciadores descritos en la Tabla 3.2. Para la amplificación del *ERG11* de *C. tropicalis* se utilizaron iniciadores previamente descritos (Vandeputte y col., 2005). Para la amplificación del *ERG3* se diseñaron nuevos iniciadores basados en la secuencia del gen *ERG3* ($\Delta 5,6$ esteroide desaturasa) de *C. tropicalis* MYA-3404 (GenBank XM002550136). Todos los iniciadores fueron sintetizados por Sigma Genosys (Madrid, Spain). Se recibieron liofilizados y se resuspendieron en 1 mL de agua estéril (Sigma).

Tabla 3.2. Iniciadores usados para las diferentes PCRs y secuenciación de genes *ERG*

Gen	Iniciador	5' – 3'	Secuencias	Referencia
ERG3	PF1*	D	TGGATATCGTTCTTGAAATTTG	Este trabajo
	PR1	R	AACTGGAATGGCTCTAGTTG	Este trabajo
	PF2	D	TCTTATCCCTTTTCATAGTTAC	Este trabajo
	PR2	R	CCAATAATTACCATCATGAATC	Este trabajo
	PF3	D	TGCTTTCCATCCAGTTGATG	Este trabajo
	PR3*	R	GTCATCAACTTTACCTTCAAG	Este trabajo
ERG11	PF1*	D	TCTGACATGGTGTGTGTGTG	Vandeputte y col. (2005)
	PR1	R	ATTGATGCCATCAATGGCAG	Vandeputte y col. (2005)
	PF2	D	ATCCCACAGGCTTATTTGAAA	Vandeputte y col. (2005)
	PR2	R	GGTCTCTTTCCTTGGTTTTG	Vandeputte y col. (2005)
	PF3	D	TGCTGAAGAAGCTTATACCC	Vandeputte y col. (2005)
	PR3	R	CAAGGAATCAATCAAATCTCTC	Vandeputte y col. (2005)
	PF4	D	GGTGGTCAACATACTTCTGC	Vandeputte y col. (2005)
	PR4	R	AGCAGGTTCTAATGGTAAGG	Vandeputte y col. (2005)
	PF5	D	AAACGGTGATAAGGTTCCAG	Vandeputte y col. (2005)
	PR5	R	TCCCAAGACATCAAACCCTG	Vandeputte y col. (2005)
	PR5b*	R	TGCGGTACAGGTGATCTGTG	Este trabajo

Los asteriscos indican los iniciadores que se utilizaron para amplificación y además para la secuenciación. D; directo, R; reverso.

3.4.3.2. Extracción de ADN

La extracción de ADN genómico de todas las cepas se realizó utilizando el minikit DNeasy Plant (QIAGEN Inc., Valencia, Calif) siguiendo las indicaciones del fabricante. Para el análisis del ADN se utilizaron geles de agarosa de 0,8 % (Sigma) preparados en tampón TAE (1X). La solución de agarosa se calentó en microondas hasta total disolución y se dejó solidificar. Para realizar la cuantificación de ADN genómico de las cepas, estas se mezclaron con un tampón de carga antes de realizar las electroforesis y se depositaron en un gel de agarosa para la electroforesis, con diferentes diluciones del ADN de fago lambda (50 ng/ µL, 10 ng/ µL y 2 ng/ µL). Finalmente la cantidad de ADN se

calculó comparando la intensidad de las muestras teñidas con bromuro de etidio con la obtenida con las diferentes concentraciones del fago lambda.

3.4.3.3. Condiciones de PCR y secuenciación

Las condiciones de la amplificación fueron iguales para ambos genes: 5 min de desnaturalización a 94°C, seguido de 30 ciclos de 30 s a 94°C, 40 s a 50°C para el anillamiento y 60 s a 72°C para la elongación. Por ultimo, un ciclo de elongación a 72°C durante 10 min. Los productos de la PCR se purificaron con el kit High Pure PCR products purification kit (Roche Diagnostics, Madrid, España) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para el análisis de fragmentos de DNA se utilizaron geles de agarosa de 0,8 % preparados con agarosa (Sigma) disuelta en tampón TAE (1X) como se ha descrito previamente. Estos productos se utilizaron como molde para la secuenciación la cual se llevó a cabo con el kit Dye Terminator cycle sequencing quick start kit (Beckman Coulter Inc., Fullerton, Calif.). Los productos de esta nueva PCR fueron purificados con columnas de Sefarosa (Amersham Biosciences) y finalmente secuenciados con un sistema de análisis de ADN CEQ8000 (Beckman Coulter) en el Servicio de Genómica, del Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid. Para ello se utilizaron los mismos iniciadores que se utilizaron para la amplificación y una serie de iniciadores internos, en ambos sentidos, para cubrir la totalidad de la secuencia de cada gen en ambos sentidos (Tabla 3.2).

3.4.4. Análisis bioinformático de genes y proteínas

3.4.4.1. Genes descritos en este trabajo

La secuencia completa del gen *ERG11* de *C. tropicalis* ATCC 750 fue usada como secuencia referencia (GenBank Accession number M23673). La secuencia completa del gen *ERG11* de las cepas ATCC 750, ATCC 200956 y de los aislamientos clínicos de *C. tropicalis* CL-6835 y TP-13650 así como sus respectivas secuencias de aminoácidos se depositaron en GenBank con los números de acceso: KC542323, KC542324, KC542325, y KC542326 respectivamente. Asimismo, la secuencia completa del *ERG3* de *C. tropicalis* MYA-3404 se utilizó como referencia (Acceso en el GenBank número XM002550136) y las secuencias obtenidas de las cepas analizadas en este trabajo se depositaron en la base de datos del GenBank con los números de acceso KC542319, KC542320, KC542321 y KC542322, respectivamente (ver Anexos).

3.4.4.2. Identificación de mutaciones en los genes *ERG11* y *ERG3*: Análisis de secuencias

El procesamiento informático de las secuencias de ADN y proteína se realizó con los programas EditSeq, SeqBuilder, Megalign y SeqMan, (Lasergene LC, Madison, EEUU). Las secuencias de ADN se compilaron con SeqMan para conseguir la secuencia completa de *ERG11* y *ERG3* en ambos sentidos para cada cepa. Una vez editadas, se tradujeron a proteínas (Erg3p y Erg11p) y se realizaron alineamientos de secuencias de proteínas utilizando el program Megalign. Las secuencias de Erg3p y Erg11p se compararon con otras secuencias presentes en el GenBank de cepas sensibles y resistentes a los antifúngicos para identificar los cambios de aminoácidos así como de *M. tuberculosis* y *Homo sapiens* Erg11p.

El numero de acceso de las cepas utilizadas para la comparación son las siguientes: *C. albicans* (CaErg11 GenBank: ACN58387.1), *S. cerevisiae* (Sc Erg11 GenBank: AAB68433.1), *C. glabrata* (CgErg11 GenBank: AAB02329.1) *C. krusei* (CkErg11 GenBank: AAB02329.1), *S. pombe* (SpErg11 GenBank: CAA90803.1), *A. fumigatus* (AfCyp51A GenBank: AAK73659.1), *A. fumigatus* (AfCyp51b GenBank: AK73660.1), *C. neoformans* var *neoformans* (CnnErg11XP_566464.1), *C. neoformans* var *grubii* (CngErg11AAP12370.1), *M. tuberculosis* (MtErg11 GenBank NP215278) y *Homo sapiens* (HsErg11 enBank_XP004663).

3.4.5. Evaluación de la actividad de bombas de flujo

La actividad de bombas de flujo se determinó por la acumulación de rodamina 6G (R6G) (Sigma) de acuerdo al protocolo descrito previamente (Maesaki y col., 1999; Vandeputte y col., 2007). La levaduras de cultivaron en YPD durante una noche a 37°C. Tras lavar con PBS, se preparó una suspensión a una concentración de 10^7 células/mL en YPD y se incubó en agitación constante a 30°C durante 30 min en presencia de R6G (10 μ M). A continuación se realizó una dilución 1:40 en PBS y se realizó una primera determinación de la intensidad de fluorescencia (IMF) en un citómetro de flujo (FACSCalibur BD) en el canal FL2. Posteriormente se lavaron las células tres veces con PBS y nuevamente se re-suspendieron en YPD. Las células fueron nuevamente incubadas en las mismas condiciones durante 15 min y se determinó nuevamente la IMF de 10.000 células tal y como se ha descrito anteriormente. Como control negativo se incluyeron células sin la sonda.

Los datos fueron procesados con el software FlowJo 7.1.6. (Tree Star 257 Inc. OR, USA). La acumulación de R6G se determinó por comparación de la IMF de la primera y segunda medida. Los experimentos se realizaron al menos tres veces con cada cepa en diferentes días. Los resultados se representaron gráficamente con histogramas y como la IMF \pm DE.

3.5. Estandarización de un modelo alternativo en *Galleria mellonella*

3.5.1. Infección y supervivencia de *Galleria mellonella*

La infección de *G. mellonella* se realizó de acuerdo al protocolo utilizado con *C. neoformans* (Mylonakis y col., 2005). Para cada experimento se establecieron grupos de 20 larvas en un rango de peso de entre 0,2 y 0,5 g (suministrados por R. J. Mous Livebait, Holanda o Alcotán, Valencia, España). Para la infección por levaduras, los inóculos se prepararon en 10 mL de Sabouraud líquido y se incubaron durante una noche a 30°C en agitación (150 rpm). A continuación, se prepararon suspensiones de levaduras en PBS suplementado con ampicilina (20 μ g/mL), a diferente densidad celular (4×10^8 , 2×10^8 , 1×10^8 ó 5×10^7 levaduras/mL).

El tamaño del inóculo que obtuvo por recuento de levaduras con la ayuda de un hemocitómetro o contador de células automático TC10 (Bio Rad). Cada larva se inoculó con 10 μ L de estas suspensiones, con lo que la dosis final fue de 4×10^6 , 2×10^6 , 1×10^6 ó 5×10^5 levaduras/larva, respectivamente. Las levaduras se introdujeron en la larva a través de la última pseudopata derecha con una jeringa Hamilton de 10 μ L (Hamilton, USA).

En el proceso de estandarización del modelo se incluyeron, además de los grupos infectados y tratados, los siguientes grupos: larvas sin inocular, larvas pinchadas y larvas pinchadas e inoculadas con 10 μ L de PBS-ampicilina. Con el fin de descartar la muerte de las larvas de debiera a otro factor diferente a la capacidad de las levaduras para infectar, se incluyó un grupo inoculado con levaduras muertas por calor (45 min; 60°C). Tras la inoculación, las larvas se incubaron a 30°C o 37°C durante 7-10 días.

Los inóculos para la infección con *A. fumigatus* y *A. lentulus* se prepararon partiendo de una suspensión a 10^8 ó 10^7 conidias/mL, lo que supuso una dosis de 10^6 y 10^5 conidias/larva, respectivamente, al inyectar 10 μ L/larva. El inóculo se obtuvo como se describió en el apartado de la sensibilidad *in vitro* (0) y el inóculo final se ajustó en PBS-Tween 0.01% con ampicilina (20 μ g/mL). Las larvas infectadas se incubaron a 37°C durante 7-10 días.

Una larva se consideró muerta cuando, además de estar melanizada, no respondió al estímulo sobre el cuerpo con una pinza. La supervivencia se registró diariamente. Cada experimento se realizó al menos tres veces. Los resultados se representan en curvas de supervivencia con el promedio de los datos de los diferentes experimentos de cada grupo y condición estudiada.

3.5.2. Cuantificación de la producción de melanina como indicador de respuesta a la infección

La melanización se evaluó como un parámetro de respuesta de *G. mellonella* durante la infección con *C. tropicalis*, de acuerdo a la metodología descrita por Rueda y col. (2014). Grupo de 10 larvas se infectaron con tres concentraciones de inóculo diferentes (10^6 , 2×10^6 ó 4×10^6 levaduras/larva) de la cepa ATCC 750 o de la ATCC 200956. Además se incluyó un grupo control de larvas inoculadas con PBS-ampicilina. Tras 1 h de incubación a 37°C, se obtuvo la hemolinfa mediante una incisión apical en cada larva con un bisturí estéril. La hemolinfa se diluyó diez veces en PBS frío e inmediatamente se centrifugó a 12.000 rpm (13.800 g) para eliminar restos celulares. Finalmente se determinó la D.O. a 405 nm en un espectrofotómetro DYNEX-MRX Technologies (Worthing, UK).

3.5.3. Densidad hemocitaria

Grupos de 10 larvas se inocularon con 4×10^6 levaduras/larva y se incubaron a 37°C durante 2 y 7 h. Al cabo de cada tiempo, se realizó una incisión en la parte ventral de la larva, y se recogieron 50 µL de hemolinfa en el mismo volumen de tampón salino fisiológico de insectos (IPS; 150 mM cloruro de sodio, 5 mM cloruro potásico, 10 mM Tris-HCl pH 6.9, 10 mM EDTA y 30 mM citrato de sodio) (Fuchs y col., 2010). Finalmente se realizó una dilución 1:10 en el mismo tampón y se determinó la concentración de hemocitos en un hemocitómetro. Además, se analizaron en paralelo larvas no infectadas o inoculadas con PBS como controles. Los resultados fueron expresados como número de hemocitos/mL.

3.5.4. Fagocitosis *in vivo*

Para evaluar el porcentaje de fagocitosis *in vivo*, se inocularon larvas con levaduras teñidas con blanco de calcoflúor. Para ello, se prepararon suspensiones de levaduras a una concentración de 10^9 células/mL en tampón IPS y se añadió calcoflúor (10 µg/mL, Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA). Las muestras se incubaron durante 30 min a 37°C y se procedió a inyectar 10 µL en cada larva. Tras 2 h de incubación de las

larvas a 37°C, se recolectó la hemolinfa en IPS tal y como se ha descrito anteriormente. La suspensión celular se centrifugó a 2.000 rpm (3.000 g) durante 4 min en una microcentrífuga Biofuge Fresco (Heraeus) y el precipitado se resuspendió en 50 µL de IPS. Los hemocitos (10 µL) se colocaron sobre un portaobjetos y fueron observados en un microscopio de fluorescencia (Leica DMI 3000B) con un objetivo (63X). Las muestras se examinaron tanto en campo claro como con el filtro de fluorescencia azul para poder identificar hemocitos que contenían levaduras en su interior. Se contaron 100 hemocitos para determinar el porcentaje de células que contenían levaduras fagocitadas. Los experimentos se realizaron por triplicado en días diferentes.

3.5.5. Morfología de levaduras *in vivo*

Las levaduras se cultivaron e inocularon en larvas de *G. mellonella* como se ha indicado anteriormente (2×10^6 levaduras/larva). Tras incubar a 37°C durante 24 h, las larvas se maceraron en 1 mL de tampón IPS, con la ayuda de filtros de nylon de un tamaño de poro de 100 µm (Becton Dickinson) y émbolos de jeringas de 20 mL. El homogeneizado se transfirió a tubos de 1,5 mL (Eppendorf), se centrifugó en una microcentrífuga Biofuge Fresco (Heraeus) a 2.000 rpm (3.000 g) y el sedimento se resuspendió nuevamente en el mismo volumen del tampón. Las muestras se tiñeron con blanco de calcoflúor como se ha descrito previamente. La morfología de las levaduras se observó en un microscopio de fluorescencia Leica DMI 3000B. La longitud de las blastoconidias y de los filamentos se determinó utilizando el software Leica applications suite LAS 3.3.1. Para comparar los cambios en la morfología y tamaño de las blastoconidias, las levaduras se midieron a tiempo cero (larvas maceradas inmediatamente tras la infección).

3.5.6. Estudio histológico de tejido larvario

Para observar la organización de las levaduras y/o filamentos en el tejido de *G. mellonella*, se tomaron 3 larvas por cada condición y se fijaron en formalina (4%) tamponada con fosfato (pH, 6,9) durante 24 h. Posteriormente las larvas fueron colocadas en casetes histológicos y se deshidrataron progresivamente con concentraciones crecientes de etanol (70%, 80%, 90%, 96% y 100%). Seguidamente, las muestras fueron tratadas con xileno e incluidas en parafina. De cada muestra se obtuvieron cortes de 5 µm que fueron colocados sobre portaobjetos y coloreados con ácido periódico de Schiff (PAS). Las muestras se observaron en un microscopio Leica DMI 3000B.

3.5.7. Evaluación de la eficacia de antifúngicos en *G. mellonella*

3.5.7.1. Infección de *G. mellonella* con *C. tropicalis* y tratamiento antifúngico

Las larvas fueron infectadas con inóculos de 2×10^6 ó 4×10^6 levaduras/larva (según cepa y experimento), tal y como se ha descrito anteriormente. La concentración del inóculo se comprobó mediante recuento de unidades formadoras de colonias (UFCs) en placas de Sabouraud. Para los tratamientos, se prepararon soluciones madre de cada antifúngico en DMSO, las cuales se diluyeron en agua estéril para inyección (Braun, Madrid, Spain) a las siguientes concentraciones: VCZ (400 y 80 $\mu\text{g/mL}$), FCZ (800, 360 y 80 $\mu\text{g/mL}$), AmB (120 y 80 $\mu\text{g/mL}$) y ANF (400 $\mu\text{g/mL}$). El cálculo de los tratamientos aplicados a las larvas se basó en las dosis terapéuticas usadas en humanos para cada uno de los antifúngicos (Pappas y col., 2007). De esta manera las larvas fueron tratadas con las siguientes concentraciones de antifúngicos: (i) VCZ, 4 $\mu\text{g/larva}$ (equivalente, aproximadamente, a 10 mg/kg, dosis terapéutica) y 0,8 $\mu\text{g/larva}$ (equivalente a la 5 mg/kg, dosis subterapéutica) (ii) FCZ, 8 $\mu\text{g/larva}$ (equivalente a 13 mg/kg, dosis por encima de la terapéutica), 3,6 $\mu\text{g/larva}$ (equivalente a 6 mg/kg, dosis terapéutica), y 0,8 $\mu\text{g/larva}$ (equivalente a 1,3 mg/kg, dosis subterapéutica); (iii) AmB, 1,2 $\mu\text{g/larva}$ (equivalente a 5 mg/kg, dosis terapéutica) y 0,8 $\mu\text{g/larva}$ (equivalente a 3 mg/kg, dosis subterapéutica) y (iv) AND, 4 $\mu\text{g/larva}$ (equivalente a 10 mg/kg).

3.5.7.2. Infección de *G. mellonella* con *Aspergillus* spp y tratamiento antifúngico.

La eficacia de AmB y VCZ se evaluó en un modelo de infección de *G. mellonella* con *A. fumigatus* y *A. lentulus*. Los inóculos (a concentraciones de 10^7 y 10^8 conidias/mL) se prepararon como se ha descrito en los apartados anteriores. Las larvas fueron infectadas con *A. fumigatus* y *A. lentulus* a dos concentraciones diferentes (10^5 y 10^6 conidias/larva) y tras 2 h de infección, se trataron con AmB (0,5 ó 2 $\mu\text{g/larva}$) y VCZ (0,5 ó 4 $\mu\text{g/larva}$) correspondiendo en ambos casos a la dosis terapéutica y subterapéutica utilizada en humanos.

En todos los experimentos se incluyeron grupos de larvas no manipuladas (como control del estado de lote de larvas), larvas inoculadas con PBS (como control del efecto pinchaza) o con la dosis más alta de cada antifúngico (como control de toxicidad). Las larvas se incubaron a 37°C y la supervivencia se monitorizó diariamente. Los experimentos de protección con antifúngicos repitieron por duplicado y al menos tres veces en días diferentes.

3.5.7.3. Determinación de la carga fúngica

La carga fúngica en larvas infectadas se determinó por recuento de UFCs a diferentes tiempos tras la inoculación de las larvas con y sin tratamiento antifúngico (0, 1, 2, 3, 4 y 5 días). Para ello, cinco larvas por grupo y día se desinfectaron con etanol (70%) y se cortaron en pequeñas piezas con un bisturí. Estas secciones se resuspendieron en 2 mL de PBS-ampicilina (20 µg/mL) y se transfirieron a tubos cónicos (Falcon) de 15 mL que contenía bolas de vidrio de 4 mm de diámetro (Merck) en una cantidad equivalente al volumen ocupado por el tejido larvario. La mezcla se homogenizó suavemente con un vórtex durante unos segundos. Al macerado obtenido se agregó PBS-ampicilina (20 µg/mL) con el fin de lavar el tejido y las bolas de vidrio y así evitar perder levaduras en los restos de tejido o en las bolas. El líquido con el cual se lavó el tejido se transfirió a un tubo nuevo y se realizaron diluciones seriadas de las cuales se cultivaron 50 µL en placas de Sabouraud agar-cloranfenicol. Estos fueron incubados a 37°C. Tras 48 h, se realizó el recuento de UFCs.

3.6. Análisis estadístico

Los datos se expresaron como la Media (MD) \pm desviación estándar (DE) de los diferentes experimentos. La significancia estadística se analizó con el análisis de varianza de una vía ANOVA y posteriormente aplicación de la comparación múltiple de Bonferroni. En algunos casos el valor de p se calculó con la t de Student. Las diferencias en el contenido de esteroides y en la producción de melanina por *G.mellonella* tras la infección con *C. tropicalis* se analizaron con la prueba no paramétrica Mann-Whitney. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con un valor de $p < 0,05$. Las curvas de supervivencia de *G. mellonella* se ajustaron usando el test de Kaplan-Meier, y las diferencias entre diferentes curvas de supervivencia se evaluaron usando la prueba Log-rank (Mantel-Cox). Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism 5 (La Jolla CA, USA) y se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,01$.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Mecanismo de acción de la anfotericina B

La anfotericina B (AmB) es uno de los antifúngicos más utilizados en la práctica clínica. Sin embargo, su mecanismo de acción no está bien definido. En la primera parte de este trabajo, nos propusimos investigar la importancia de la producción de radicales libres en el mecanismo de acción de la AmB. Para el desarrollo de este objetivo, el trabajo se realizó en dos partes: Inicialmente investigamos la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y el daño oxidativo en levaduras de diferentes especies sensibles a AmB. En la segunda parte, se analizó el papel del daño oxidativo en la resistencia adquirida a AmB en cepas de *C. tropicales* y *C. glabrata* de la colección del Servicio de Micología del Instituto de Salud Carlos III (Tabla 3.1).

4.1.1. Evaluación del estrés oxidativo inducido por anfotericina B en diferentes especies de levadura

En primer lugar, evaluamos si la producción de ROS ocurre de forma similar en diferentes especies de levaduras patógenas. Para ello, se seleccionaron varias cepas, incluyendo tanto *Candida* spp. como *Cryptococcus* spp. Las levaduras se expusieron a diferentes concentraciones de AmB. En la Figura 4.1 (A y B) se representa el porcentaje de células que acumularon ROS en respuesta al tratamiento con 2 µg/mL ó 8 µg/mL de AmB tras 1 y 3 h de incubación. La proporción de células que acumularon ROS fue más lenta similar en todas las especies ($p > 0,05$) exceptuando *C. tropicalis* y *C. krusei* en las cuales esta proporción fue significativamente más baja. En estas especies, la producción de ROS fue más lenta ya que tras 3 h de incubación la proporción de células en las que se detectó ROS incrementó.

Además de determinar el porcentaje de células que acumularon ROS, se determinó la magnitud del estrés oxidativo midiendo la IMF en las células que produjeron ROS determinado el incremento de la fluorescencia con respecto a las células control (sin tratamiento con AmB), tras 1 y 3 h de incubación (Figura 4.1 C y D). La intensidad de fluorescencia (IMF) fue muy variable entre especies, y aislados de la misma especie, por lo que no se encontró una diferencia estadísticamente significativa al compararlas todas. Estos resultados sugieren que la cantidad de ROS acumulada en la célula tras la adición de AmB es similar en todos los casos.

4.1.2. Efecto de la anfotericina B sobre las proteínas

A continuación, quisimos investigar si la producción de ROS en presencia de AmB causaba daño oxidativo en las células. Este daño se puede medir con la detección de peroxidación de lípidos, de la fragmentación del ADN y/o por la carbonilación de proteínas. En nuestro caso, utilizamos este último ensayo para detectar si existía daño oxidativo en las células en presencia de AmB mediante Western blot (ver Materiales y Métodos). Para este experimento se utilizó como modelo la levadura *C. neoformans*, en la que la producción de ROS tras el tratamiento con AmB se había evaluado con anterioridad en nuestro laboratorio.

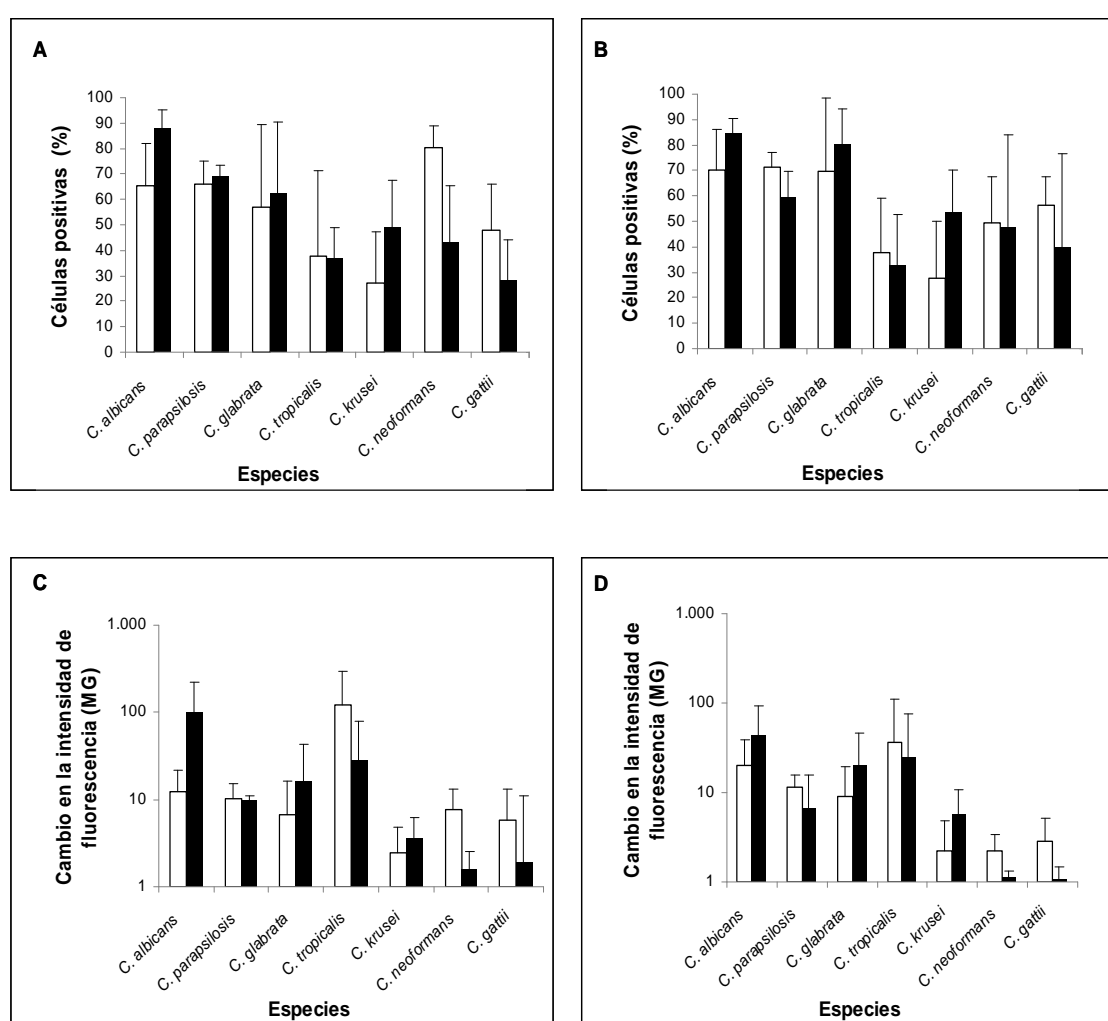


Figura 4.1. A y B corresponden al porcentaje de células que producen ROS tras el tratamiento con AmB (2 $\mu\text{g/mL}$ ó 8 $\mu\text{g/mL}$) respectivamente, después de 1 h (barras blancas) ó 3 h (barras negras) de incubación a 37°C. Los experimentos se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos usando las cepas que se listan en la Tabla 3.1. Las Figuras C y D corresponden al cambio en la intensidad de fluorescencia (IMF \pm DE) tras el tratamiento con AmB (2 $\mu\text{g/mL}$ ó 8 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) después de 1 h (barras blancas) o 3 h (barras negras).

Como se observa en la Figura 4.2 A, la AmB indujo carbonilación proteica a los diferentes tiempos estudiados. Tras procesar las imágenes obtenidas de las proteínas carboniladas y teñidas con azul de Coomassie (Figura 4.2 B), se cuantificó la intensidad de las señales y se calculó el porcentaje de la intensidad relativa (Figura 4.2 C).

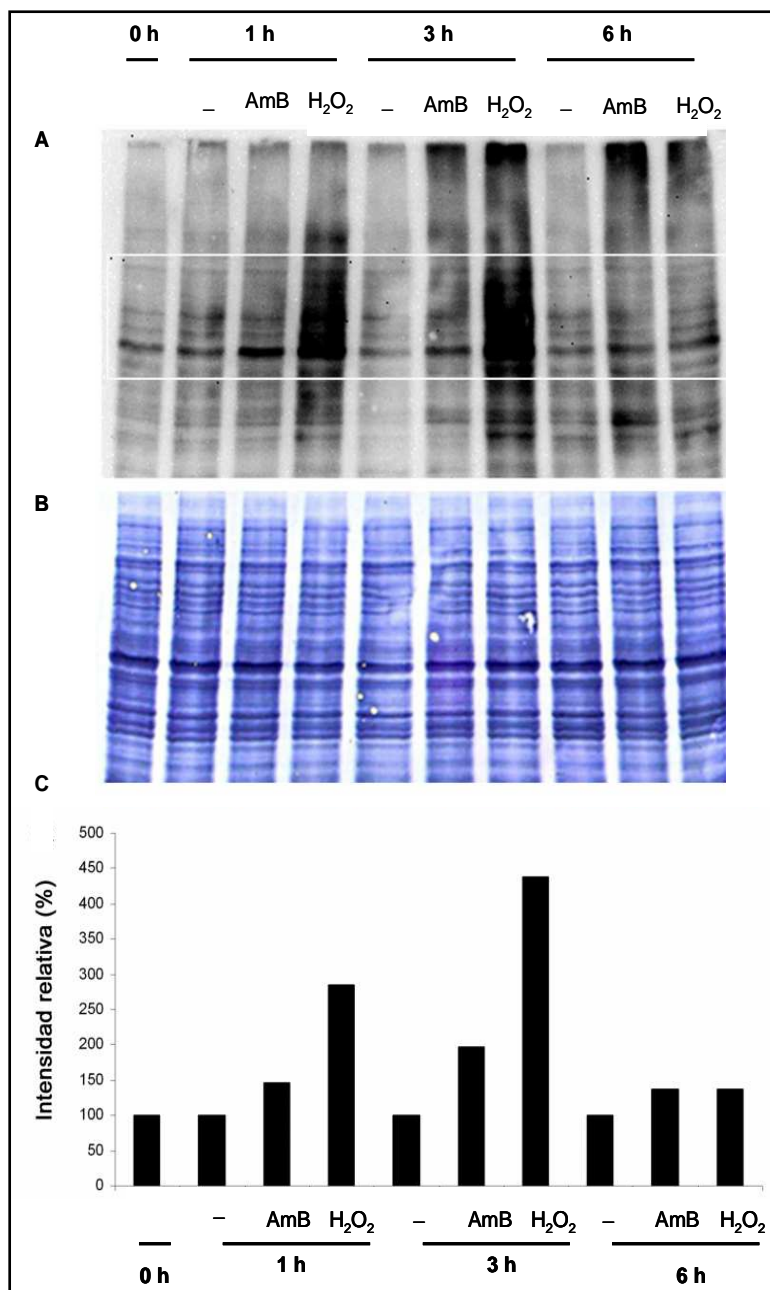


Figura 4.2. Carbonilación de proteínas en levaduras de *C. neoformans* H99 tratadas con AmB (1 µg/mL) o H₂O₂ (5 mM) durante 1, 3 ó 6 h. Levaduras no tratadas se incluyeron como controles negativos a cada tiempo. A) Western blot de proteínas carboniladas. La región demarcada entre líneas blancas se utilizó para determinar la intensidad de las bandas que se muestran en el panel C. B) Tinción con azul de Coomassie de la membrana (control de carga). C) Cuantificación de la intensidad de la carbonilación normalizada por la intensidad de la membrana coloreada con azul de Coomassie.

La carbonilación fue más intensa tras 1 ó 3 h de tratamiento, siendo menor el efecto a las 6 h, posiblemente por muerte celular. En este experimento se incluyeron

muestras tratadas con H_2O_2 como control positivo. El peróxido de hidrógeno también produjo una fuerte carbonilación en las proteínas en los primeros tiempos de incubación, la cual disminuyó también al cabo de 6 h de tratamiento. La carbonilación observada en presencia de H_2O_2 fue mayor que la obtenida en muestras tratadas con AmB.

4.1.3. Efecto de la L-cisteína sobre la producción de ROS y de la viabilidad de *C. tropicalis* en presencia de anfotericina B

Ya que la AmB induce producción de ROS y daño oxidativo en las células, investigamos el efecto de la L-cisteína, que es un aminoácido que tiene propiedades antioxidantes porque es fácilmente oxidable gracias a la presencia de grupos tiol en su estructura (Boronat y col., 2014). La L-cisteína, por si sola no indujo producción de ROS ni muerte de las levaduras de *C. tropicalis* ATCC 750 (Figura 4.3 A) a diferencia de lo observado con las tres concentraciones de AmB con las que se detectó producción de ROS y muerte celular, principalmente a la concentración más elevada (Figura 4.3 B). Cuando las células se pre-trataron con diferentes concentraciones de L-cisteína (0, 20, 40 ó 80 mM), la AmB no indujo producción de ROS (histogramas Figura 4.3 C, D, y E). En este experimento, diferentes diluciones de las levaduras se colocaron en placas de Sabouraud para evaluar la mortalidad celular. Como se muestra en las Figura 4.3 (C, D, y E), la L-cisteína contrarrestó el efecto fungicida de la AmB, produciendo un incremento de la viabilidad en comparación con las muestras no tratadas con el antioxidante.

4.1.4. Efecto de la rotenona sobre la actividad antifúngica de anfotericina B

Los radicales libres se forman principalmente en la mitocondria como subproductos de la cadena respiratoria. Por ello, quisimos investigar si la inhibición del complejo I producía disminución en la cantidad de ROS acumulada en presencia de AmB. Este experimento se llevó a cabo con rotenona, que inhibe específicamente la actividad del complejo I. En primer lugar, estandarizamos las condiciones para identificar las concentraciones de rotenona que inhibieran el crecimiento de la levadura pero que no produjeran muerte celular. Para ello, realizamos curvas de crecimiento, en las que además de las diferentes concentraciones de rotenona, se incluyeron controles que tenían la misma concentración del solvente (DMSO) en el que se había disuelto el inhibidor. En la Figura 4.4, se observan las curvas de crecimiento con las concentraciones de rotenona que produjeron inhibición significativa del crecimiento, aunque a concentraciones altas también se produjo un poco de inhibición por el solvente.

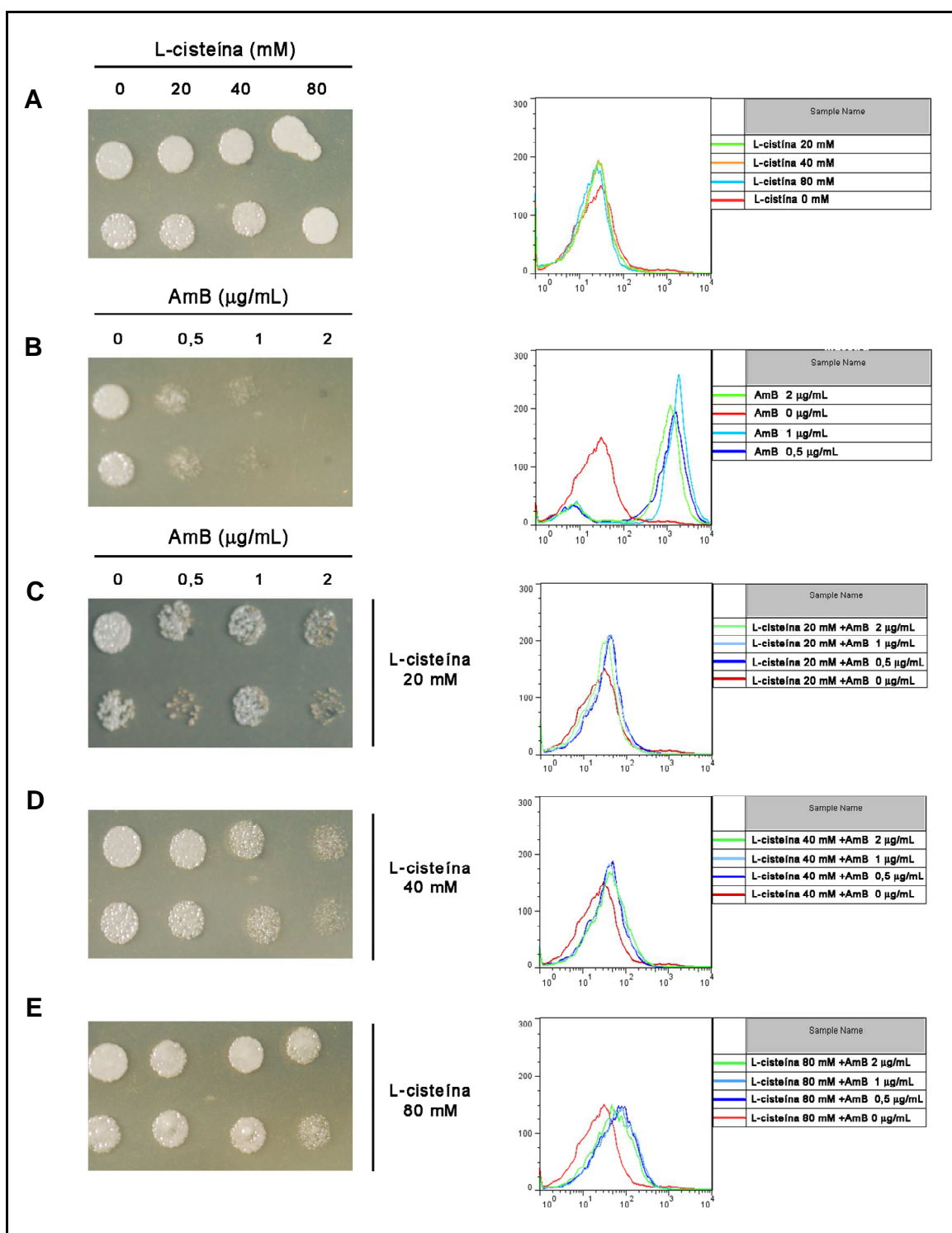


Figura 4.3. Viabilidad (columna derecha) y detección de ROS (columna izquierda) en *C. tropicalis* ATCC 750 tratadas con diferentes concentraciones de L-cisteína (0, 20, 40 ó 80 mM)(A), AmB (0, 0,5, 1 ó 2 µg/mL) (B), L-cisteína 20 mM + AmB (0,5, 1 ó 2 µg/mL) (C), L-cisteína 40 mM + AmB (0,5, 1 ó 2 µg/mL) (D) y L-cisteína 80 mM + AmB (0,5, 1 ó 2 µg/mL) (E). Los histogramas de la columna derecha corresponden a la detección de ROS con los diferentes tratamientos.

Una vez terminada la incubación de 48 h, se tomaron siete (7) µL de cada pocillo y se cultivaron en placas de Sabouraud para comprobar la viabilidad de las levaduras. En

la Figura 4.5 se observa que las levaduras crecieron en placas de Sabouraud, incluso en aquellos en los que se sembraron a partir de pocillos en los que el crecimiento había sido totalmente inhibido por la rotenona, lo que indica que este inhibidor bloquea el crecimiento y replicación celular, pero no mata las células.

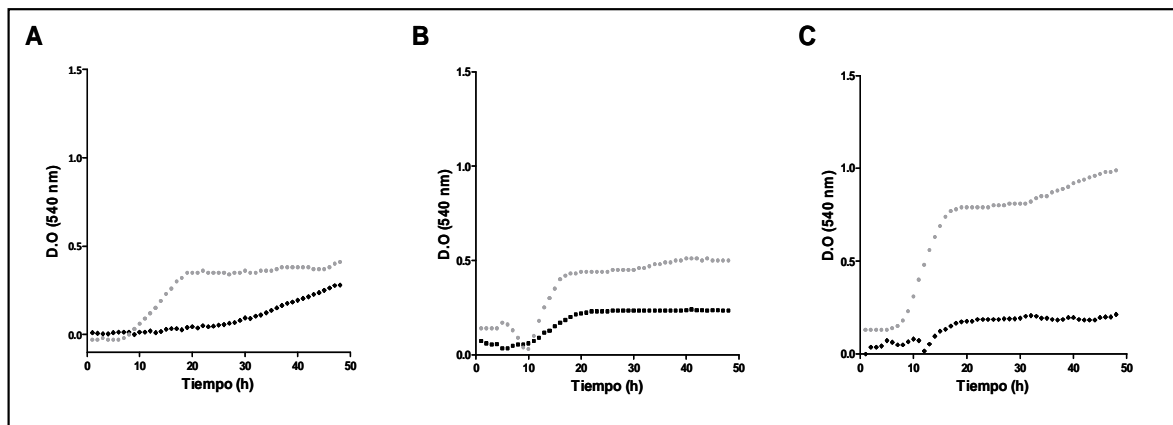


Figura 4.4. Curvas de crecimiento de *C. tropicalis* (ATCC 750) en presencia de rotenona (líneas negras). A) Rotenona a 0,625 mM, B) Rotenona a 0,312 mM, C) Rotenona a 0,156 mM. Las líneas gris corresponde al crecimiento con el solvente (DMSO a 0,625, 0,312 ó 0,156 %, respectivamente).

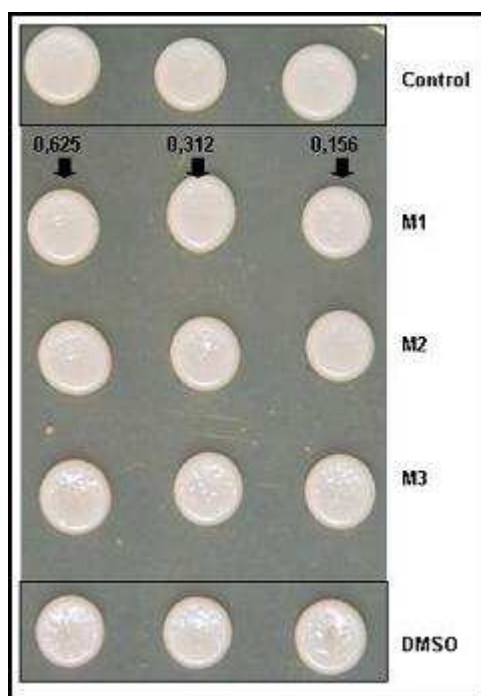


Figura 4.5. Cultivo de las muestras de *C. tropicalis* ATCC 750. Control de crecimiento (sin tratamiento). Muestras por triplicado de las levaduras expuestas a las tres concentraciones de rotenona evaluadas (0,625, 0,312 ó 0,156 mM). Control de crecimiento con el solvente de la rotenona (DMSO) a cada una de las concentraciones utilizadas (0,625, 0,312 ó 0,156 % en orden de izquierda a derecha).

Una vez confirmada la viabilidad de las células con las concentraciones seleccionadas de rotenona, se evaluó el efecto de este inhibidor sobre la producción de ROS en ausencia o en presencia de AmB. La rotenona no indujo producción de ROS ni

muerte de las levaduras (Figura 4.6 A). Además, cuando las células se pre-trataron con las diferentes concentraciones de rotenona (0,625, 0,312 ó 0,156 mM), y después se añadió AmB, el antifúngico no indujo acumulación ROS. Además, la rotenona protegió a las células del efecto fungicida de la AmB (Figura 4.6 C, D y E).

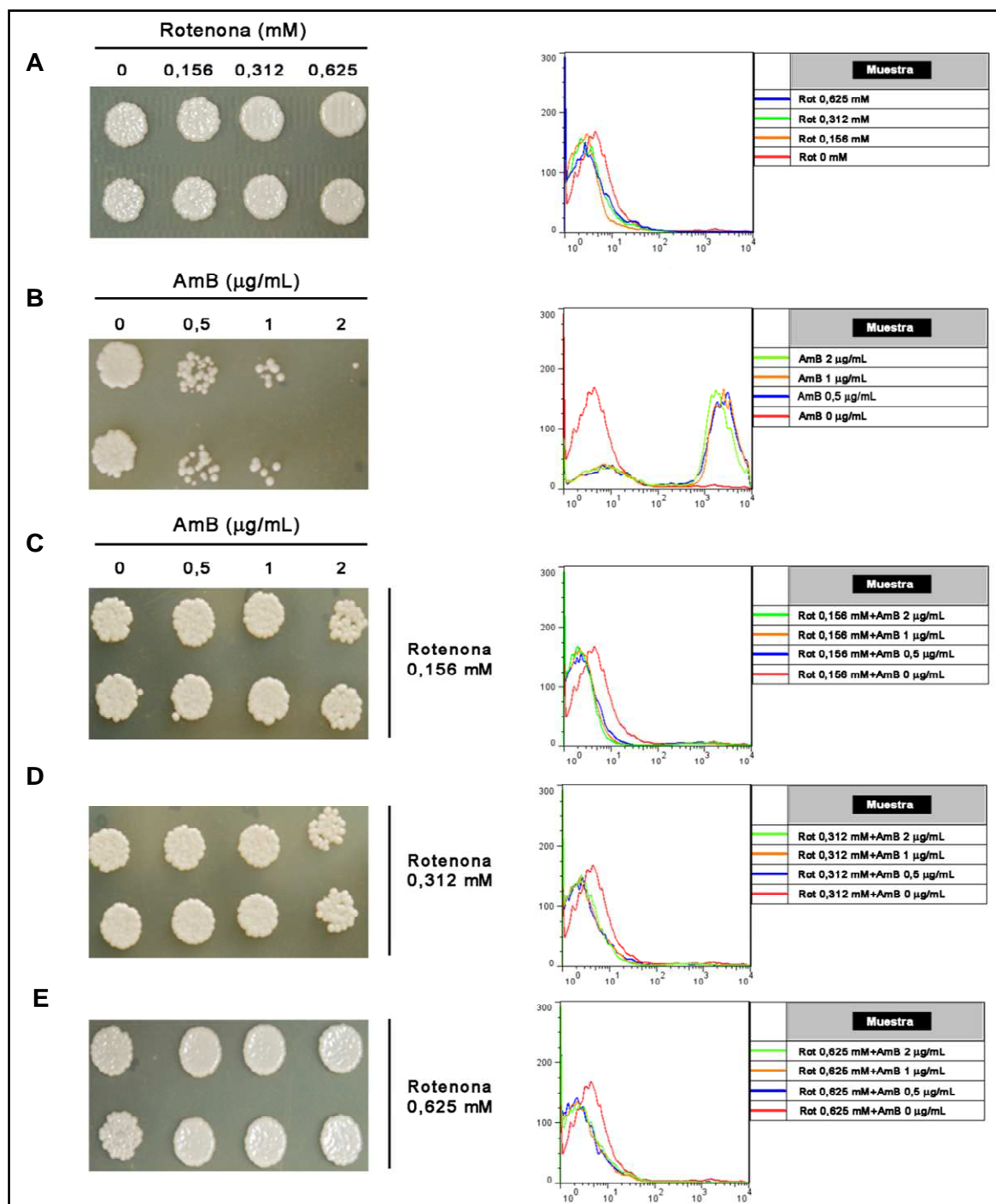


Figura 4.6. Viabilidad (izquierda) y detección de ROS (derecha) en levaduras de *C. tropicalis* ATCC 750 tratadas con diferentes concentraciones de rotenona (0, 0,625, 0,312 ó 0,156 mM) (A), AmB (0, 0,5, 1 ó 2 µg/mL) (B), rotenona 0,156 mM + AmB (0,5, 1 ó 2 µg/mL) (C), rotenona 0,312 mM + AmB (0,5, 1 ó 2 µg/mL) (D) y rotenona 0,625 mM + AmB (0,5, 1 ó 2 µg/mL) (E). Las muestras con rotenona además contienen las respectivas concentraciones de DMSO (0,625, 0,312 ó 0,156 %) en las que se disolvió el inhibidor. Los histogramas de la columna derecha corresponden a la detección de ROS con los diferentes tratamientos.

4.2. Relación entre estrés oxidativo y resistencia a anfotericina B

En una segunda parte del trabajo nos propusimos investigar si había alteración en la producción de ROS en cepas resistentes a AmB. Para este fin se seleccionaron cepas de *C. tropicalis* con diferentes perfiles de susceptibilidad a AmB y estudiamos su comportamiento tras la exposición a este antifúngico.

Tabla 4.1. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) ($\mu\text{g/mL}$) de diferentes antifúngicos con cepas de *Candida* spp.

Cepa	Especie	AmB	FCZ	VCZ	ITZ	ANF
<i>C. tropicalis</i>	ATCC 750	0,125 - 0,250	0,5	0,03	0,015	0,03
<i>C. tropicalis</i>	ATCC 200956	1 - 2	>64	>8	>8	0,03
<i>C. tropicalis</i>	CL - 6835	1 - 2	>64	>8	>8	0,03
<i>C. tropicalis</i>	CL - 7099	0,25	0,5	0,0156	0,12	0,03
<i>C. tropicalis</i>	CL - 7119	0,25	0,5	0,125	0,06	0,03
<i>C. tropicalis</i>	TP - 13650	0,25	>64	>8	>8	0,03
<i>C. glabrata</i>	CL - 7943	1-2	1	0,03	0,06	0,03
<i>C. glabrata</i>	CL - 8754	0,12	1	0,12	0,25	0,03

4.2.1. Estrés oxidativo y resistencia adquirida a anfotericina B

La frecuencia de aparición de cepas con resistencia a AmB es muy baja, pero en la colección de levaduras del Servicio de Micología se disponía de dos cepas de *C. tropicalis* (ATCC 200956 y CL-6835) y una de *C. glabrata* (CL-7943) con valores de CMI a AmB elevados (Tabla 4.1). Ambos aislados de *C. tropicalis* eran también resistentes a los azoles. Como controles se utilizaron cepas de ambas especies sensibles a AmB. Además, se incluyó una cepa resistente de *C. tropicalis* resistente a los azoles (TP-13650).

4.2.1.1. Determinación de la producción de ROS en cepas sensibles y resistentes a anfotericina B

A continuación estudiamos si existía relación entre la sensibilidad a AmB y la producción de ROS en cepas de *Candida* spp. Con este fin se trataron las diferentes cepas con AmB y H_2O_2 (como control) durante dos tiempos (1 y 3 h). En la Figura 4.7 se muestra la producción de ROS evaluada por citometría de flujo en *C. tropicalis*.

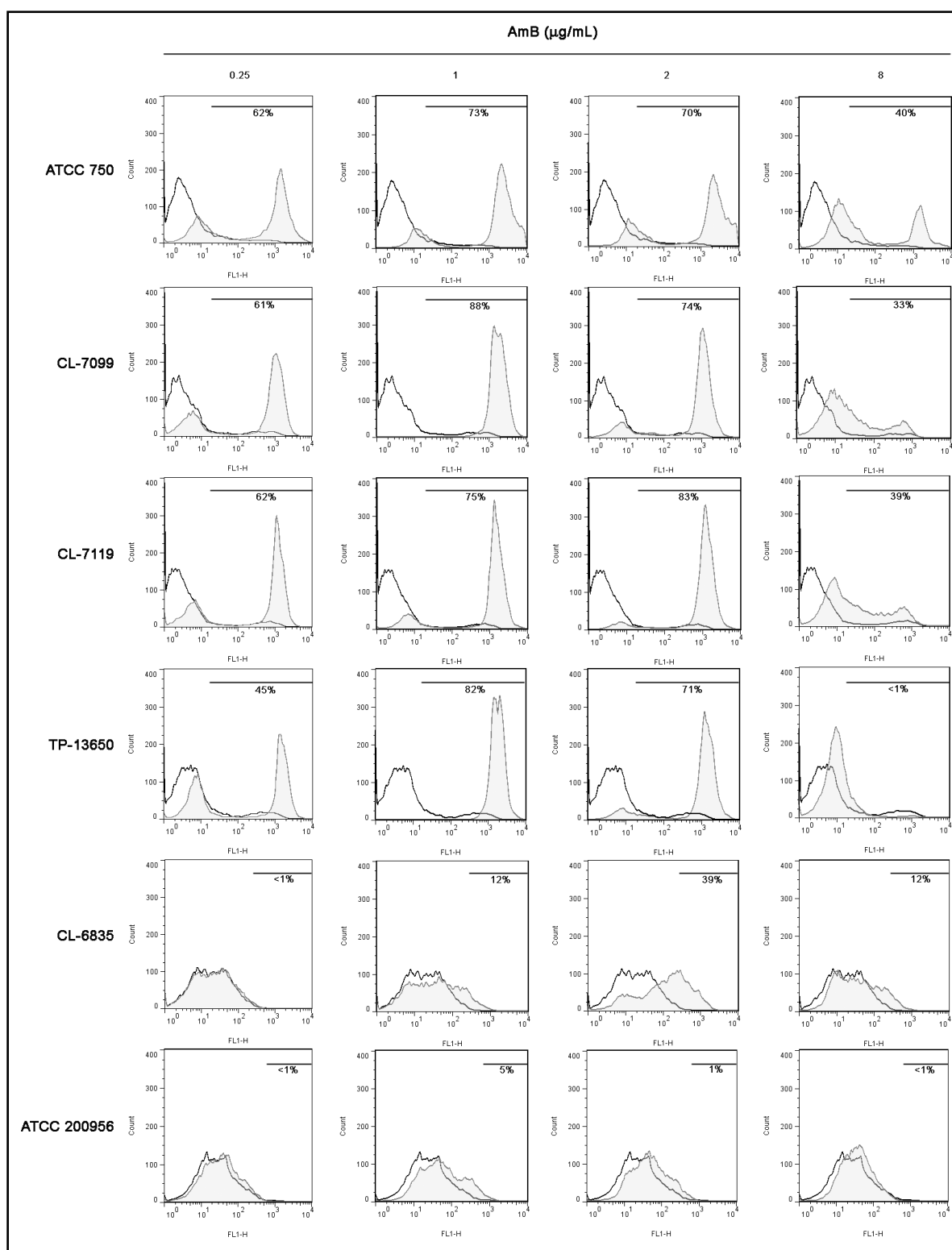


Figura 4.7. Acumulación de ROS medida por cambio en la intensidad de fluorescencia emitida por la DHF tras 1h de tratamiento de diferentes cepas de *C. tropicalis* con AmB (0,25, 1, 2 ó 8 $\mu\text{g/mL}$). Las células control (sin tratamiento) se representan con el histograma en línea negra. En cada caso se indica el porcentaje de células en las que se detectó fluorescencia.

En la Figura 4.8 se observan los resultados de la cuantificación de la fluorescencia a los diferentes tiempos y con las diferentes concentraciones de AmB. La producción de ROS en las cepas sensibles a AmB fue considerablemente mayor a la de las cepas resistentes. El incremento de ROS fue progresivo con el aumento de la concentración de AmB hasta 2 $\mu\text{g/mL}$. Con la concentración superior (8 $\mu\text{g/mL}$) se observó disminución en la producción de ROS, posiblemente debido al incremento de la muerte celular. Tras 3 h de tratamiento, aunque se observó la misma tendencia que a 1 h, la producción de ROS disminuyó en todas las cepas.

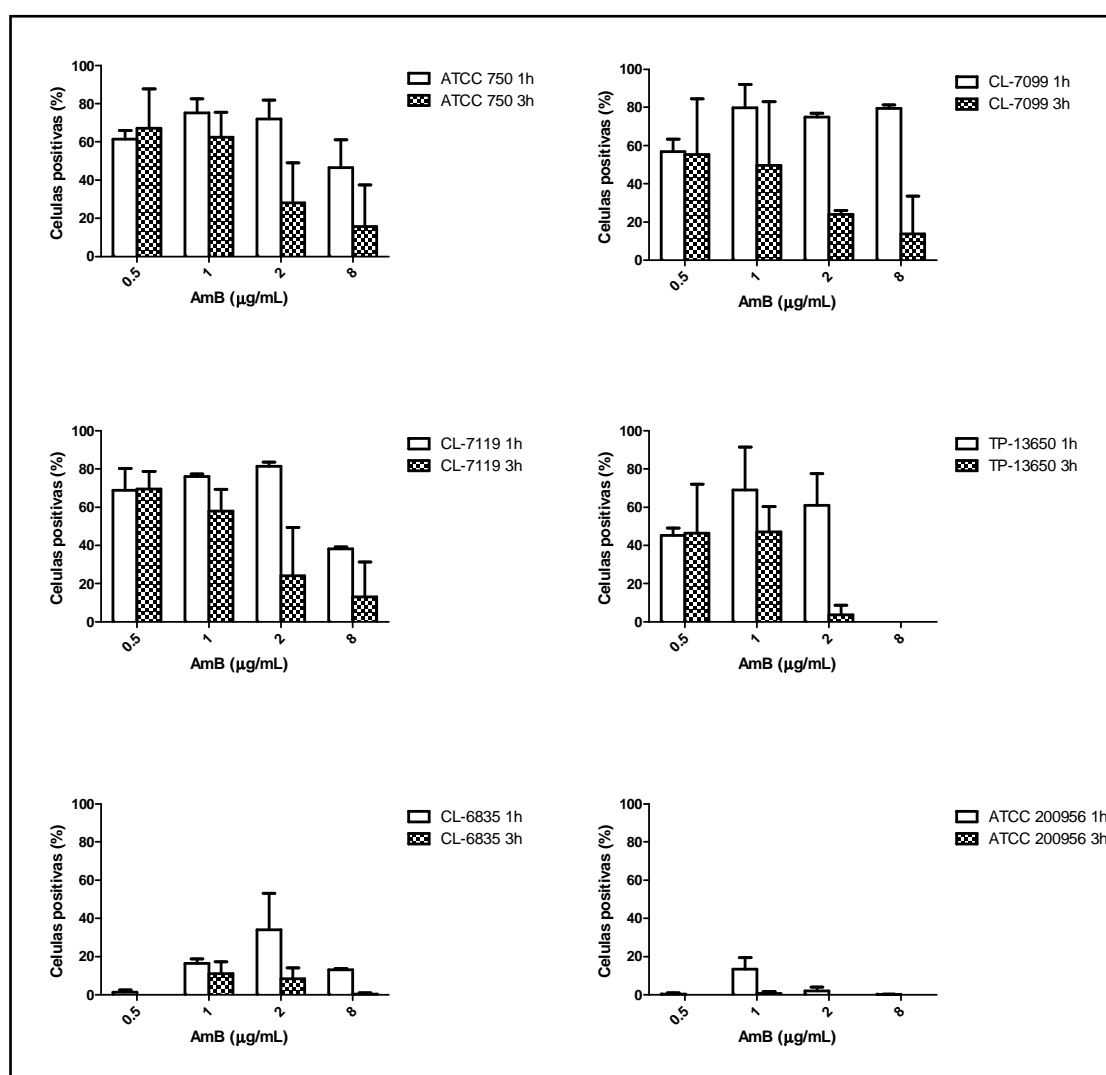


Figura 4.8. Porcentaje de células de *C. tropicalis* que acumularon ROS postratamiento con diferentes concentraciones de AmB a 1 ó 3 h. Los resultados corresponden a la MD \pm DE de los diferentes experimentos.

Ya que la producción de ROS estaba afectada en las cepas resistentes a AmB, evaluamos también el efecto del H_2O_2 . Las cepas de *C. tropicalis* sensibles a AmB también acumularon ROS al tratarlas con H_2O_2 (2,5 mM). Sin embargo, las cepas resistentes (ATCC 200956 y CL-6835) no lo hicieron. La Figura 4.9 representa la acumulación de ROS en las diferentes cepas de *C. tropicalis* después de 1h de tratamiento con el oxidante.

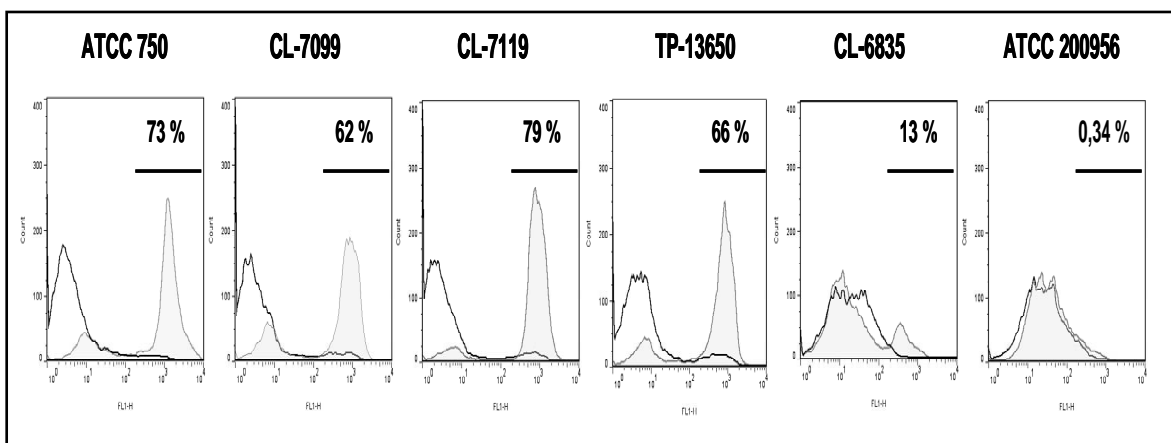


Figura 4.9. Acumulación de ROS medida por cambio en la intensidad de fluorescencia emitida por la DHF tras a 1h de tratamiento de cepas *C. tropicalis* de diferente perfil de susceptibilidad a AmB tras el tratamiento con H_2O_2 (2,5 mM). Las células control (células sin tratamiento) se representan con el histograma en línea negra. En cada caso se indica el porcentaje de células en las que se detectó fluorescencia.

Además se cuantificó el porcentaje de células que acumularon ROS después del tratamiento con H_2O_2 durante 1 ó 3 h (Figura 4.10).

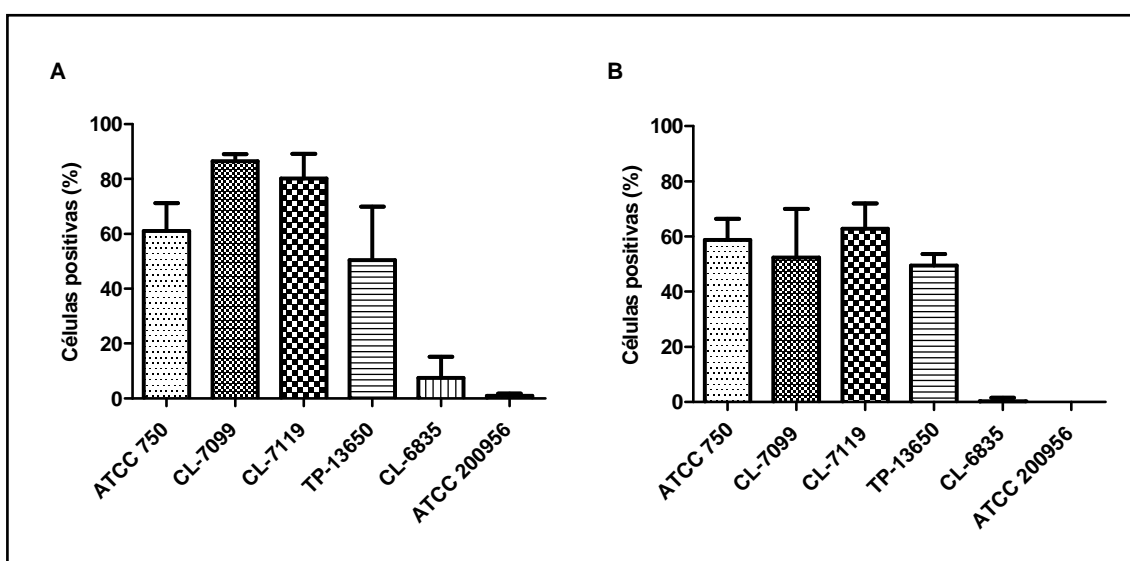


Figura 4.10. Porcentaje de células de *C. tropicalis* que acumulan ROS postratamiento con H_2O_2 (2,5 mM) a 1 ó 3 h. Los resultados corresponden a la MD \pm DS de los diferentes experimentos.

Con el fin de evaluar si el efecto observado en la cepa de *C. tropicalis* resistente a AmB se reproducía en otra especie, se procedió a evaluar la producción de ROS en una cepa de *C. glabrata* sensible a AmB y otra resistente. Los resultados mostraron un comportamiento similar al observado en *C. tropicalis*.

En la cepa sensible (CL-8754), se observó producción de ROS tanto con las diferentes concentraciones de AmB como con H_2O_2 (Figura 4.11). Sin embargo, en la cepa (CL-7943), con baja sensibilidad a AmB, no hubo acumulación de ROS en respuesta al antifúngico. Además, el H_2O_2 también indujo menor acumulación de ROS en la cepa resistente comparada con la cepa sensible.

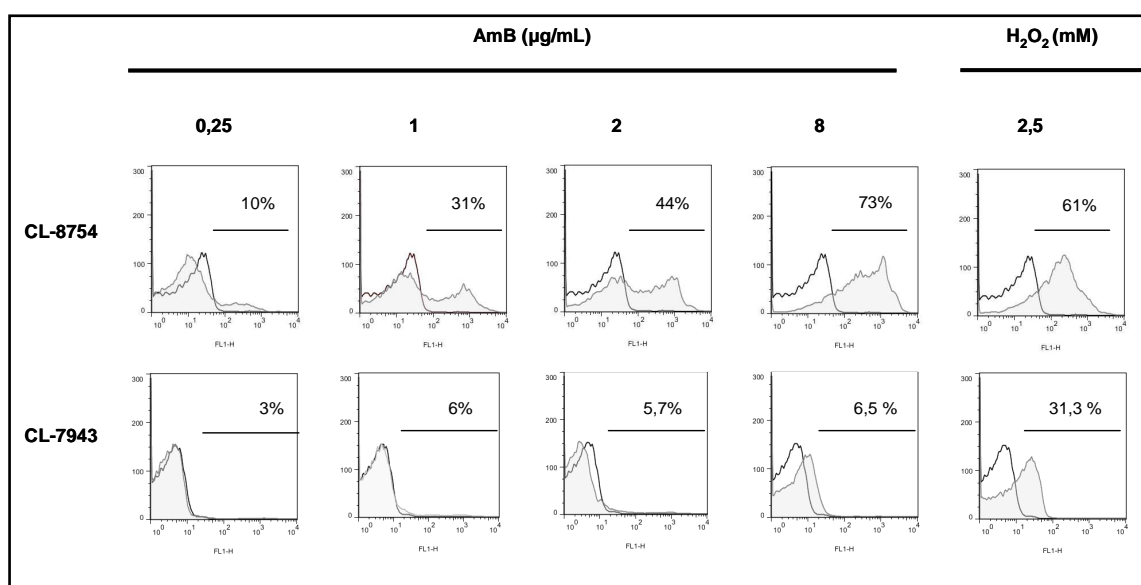


Figura 4.11. Acumulación de ROS medida por cambio en la intensidad de fluorescencia emitida por la DHF tras el tratamiento de *C. glabrata* con AmB (0, 0,25 1, 2 ó 8 µg/mL) o con H_2O_2 (2,5 mM) durante 1 h. Las células control (células sin tratamiento) se representan con el histograma en línea negra. En cada caso se indica el porcentaje de células en las que se detectó fluorescencia.

4.2.1.2. Efecto de las ROS sobre las proteínas celulares

La baja producción de ROS en las cepas resistentes a AmB nos llevó a investigar si existía un efecto diferente en la carbonilación de proteínas con respecto a una cepa sensible tras la exposición al tratamiento con el antifúngico. Para ello, tratamos una cepa resistente y una sensible con 2 µg/mL de AmB, y analizamos el perfil de carbonilación en proteínas. Como se observa en la Figura 4.12, la AmB no indujo carbonilación de proteínas en la cepa resistente, mientras que en la cepa sensible sí se observó este fenómeno al tratar con el antifúngico. El peróxido de hidrógeno indujo carbonilación de

proteínas en ambas cepas, aunque ésta fue menor en la cepa resistente comparado con la cepa sensible. Estos resultados confirman una estrecha relación entre la actividad antifúngica de la AmB y el estrés oxidativo.

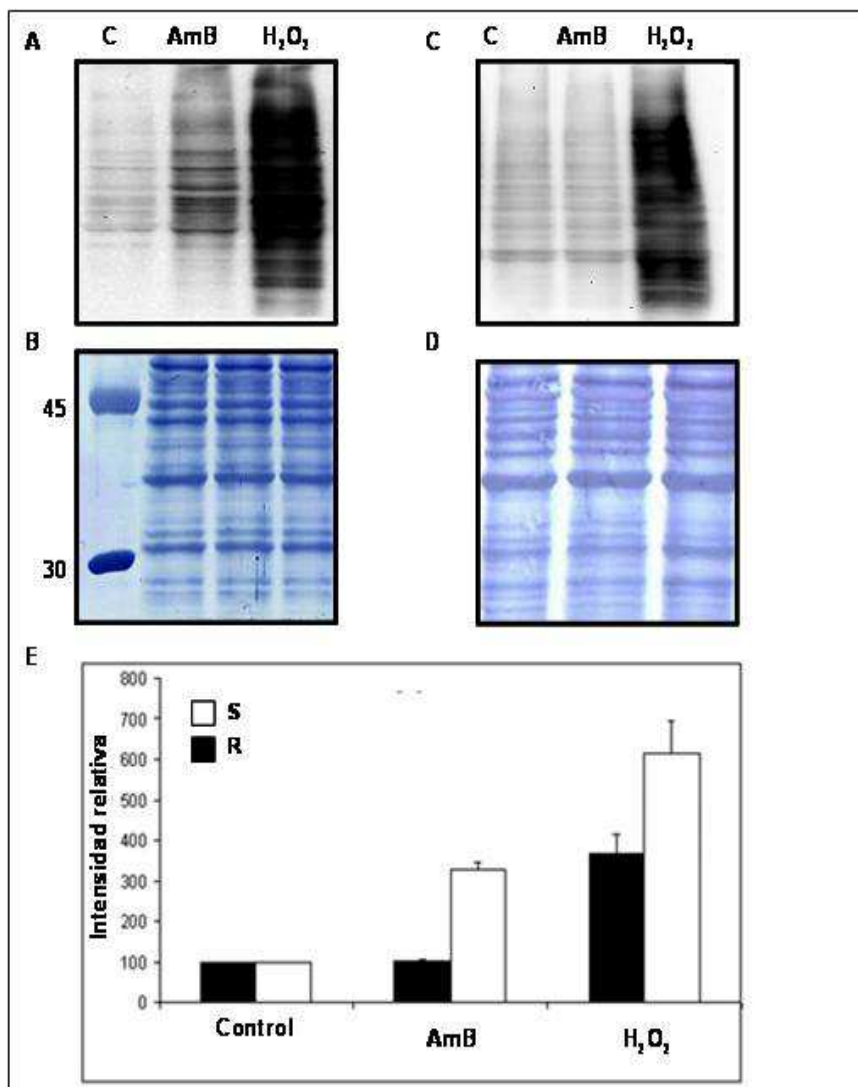


Figura 4.12. Carbonilación de proteínas en las cepas ATCC 750 (A) y ATCC 200956 (C) con las respectivas coloraciones con azul de Coomassie (B y D), tras el tratamiento con AmB (2 µg/mL) o H₂O₂ (2,5 mM). En cada muestra se incluyó un control de células sin tratamiento que se indica con la letra C. La figura E corresponde a la cuantificación de la intensidad de la señal en tres regiones seleccionadas y normalizadas con la misma área, en la membrana coloreado con azul de Coomassie.

4.2.1.3. Evaluación de la actividad catalasa

Para investigar si en las cepas resistentes había una alteración en enzimas encargadas de detoxificar radicales libres, cuantificamos la actividad catalasa en cepas

de *C. tropicalis* con diferente perfil de susceptibilidad. En la 0 se observa que la actividad catalasa fue significativamente más elevada en las cepas resistentes a AmB.

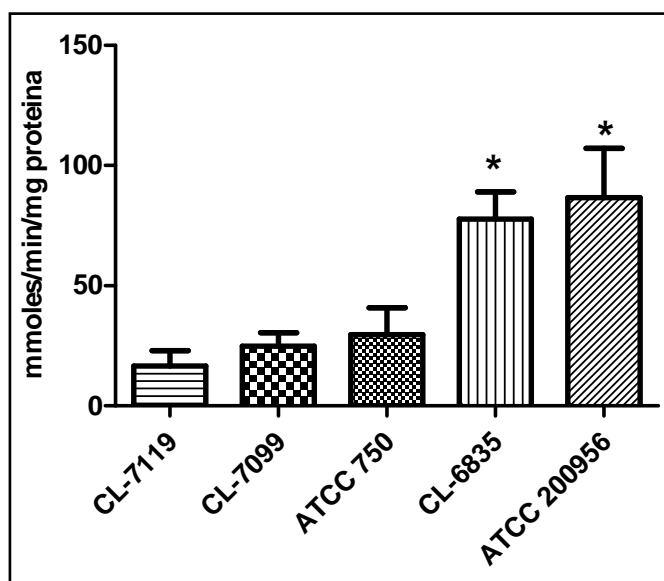


Figura 4.13. Actividad de la enzima catalasa en cepas de *C. tropicalis* de diferentes perfiles de susceptibilidad. Los asteriscos indican diferencia significativa ($p < 0,05$) entre la actividad catalasa en las cepas resistentes con respecto a las sensibles a la AmB.

4.2.2. Estrés oxidativo y resistencia intrínseca o primaria a anfotericina B

Aunque la resistencia adquirida a AmB es un fenómeno raro, la resistencia intrínseca o primaria es un fenómeno que se ha descrito con más frecuencia en hongos filamentosos que en levaduras. Por ello, quisimos investigar la producción de ROS en hongos filamentosos con baja sensibilidad a AmB. Como modelo de especie sensible, utilizamos cepas de *A. fumigatus*, y como modelos resistentes utilizamos *A. lentulus* (resistencia intrínseca) y *A. terreus* (resistencia primaria) (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Cepas de *Aspergillus* spp. con los respectivos perfiles de susceptibilidad a antifúngicos

Especie	Cepa	AmB	VCZ
<i>A. fumigatus</i>	CM-237	0,25 - 0,5	0,25 - 0,5
<i>A. fumigatus</i>	CBS 144.89	0,25	0,5
<i>A. fumigatus</i>	<i>akuB</i> ^{KU80}	0,25 - 0,5	0,25
<i>A. lentulus</i>	CM-4415	6	4
<i>A. lentulus</i>	CM-1290	1 - 4	4
<i>A. terreus</i>	CM-3951	0,5 - 2	0,5 - 1
<i>A. terreus</i>	CM-4080	4 - 16	0,12 - 1

AmB, anfotericina B; VCZ, voriconazol.

En especies de *Aspergillus* se cuantificó el porcentaje de células que produjeron ROS tras el tratamiento con diferentes concentraciones de AmB durante 3 h (Figura 4.14)

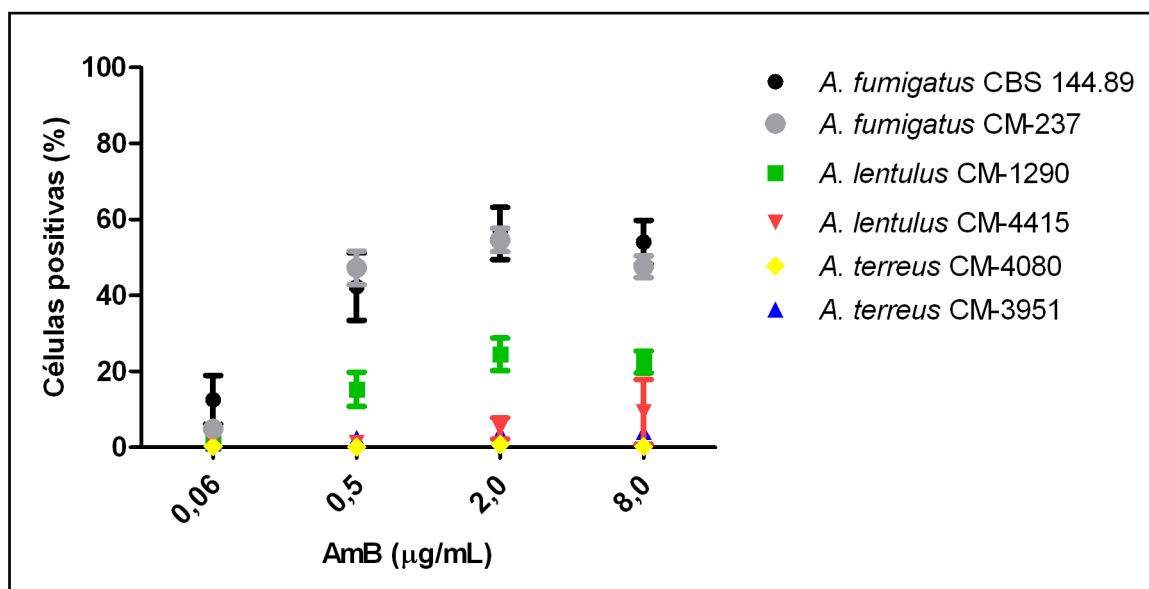


Figura 4.14. Porcentaje de células que acumulan ROS en diferentes cepas de *Aspergillus* spp., postratamiento con AmB. Los resultados corresponden a las MD \pm DE de diferentes experimentos.

Asimismo, la Figura 4.15 muestra el cambio en la intensidad de fluorescencia de las conidias de cada cepa de *Aspergillus* tras el tratamiento con AmB respecto al control (conidias sin tratamiento). En las dos cepas de *A. fumigatus*, la AmB indujo acumulación de ROS. Sin embargo, en las especies con resistencia intrínseca o baja sensibilidad a AmB (*A. lentulus* y *A. terreus*, respectivamente) la producción de ROS fue mínima tras las 3h de incubación con el antifúngico.

4.3. Caracterización fenotípica de cepas de *C. tropicalis* sensibles y resistentes a anfotericina B

4.3.1. Morfología y función mitocondrial

La producción de ROS ocurre principalmente en la mitocondria como subproducto de la cadena respiratoria. Además, esta organela se ha relacionado con resistencia antifúngica (Geraghty y Kavanagh, 2003; Sarinova y col., 2007). Por ello, decidimos estudiar si las cepas resistentes a AmB presentaban alteraciones mitocondriales.

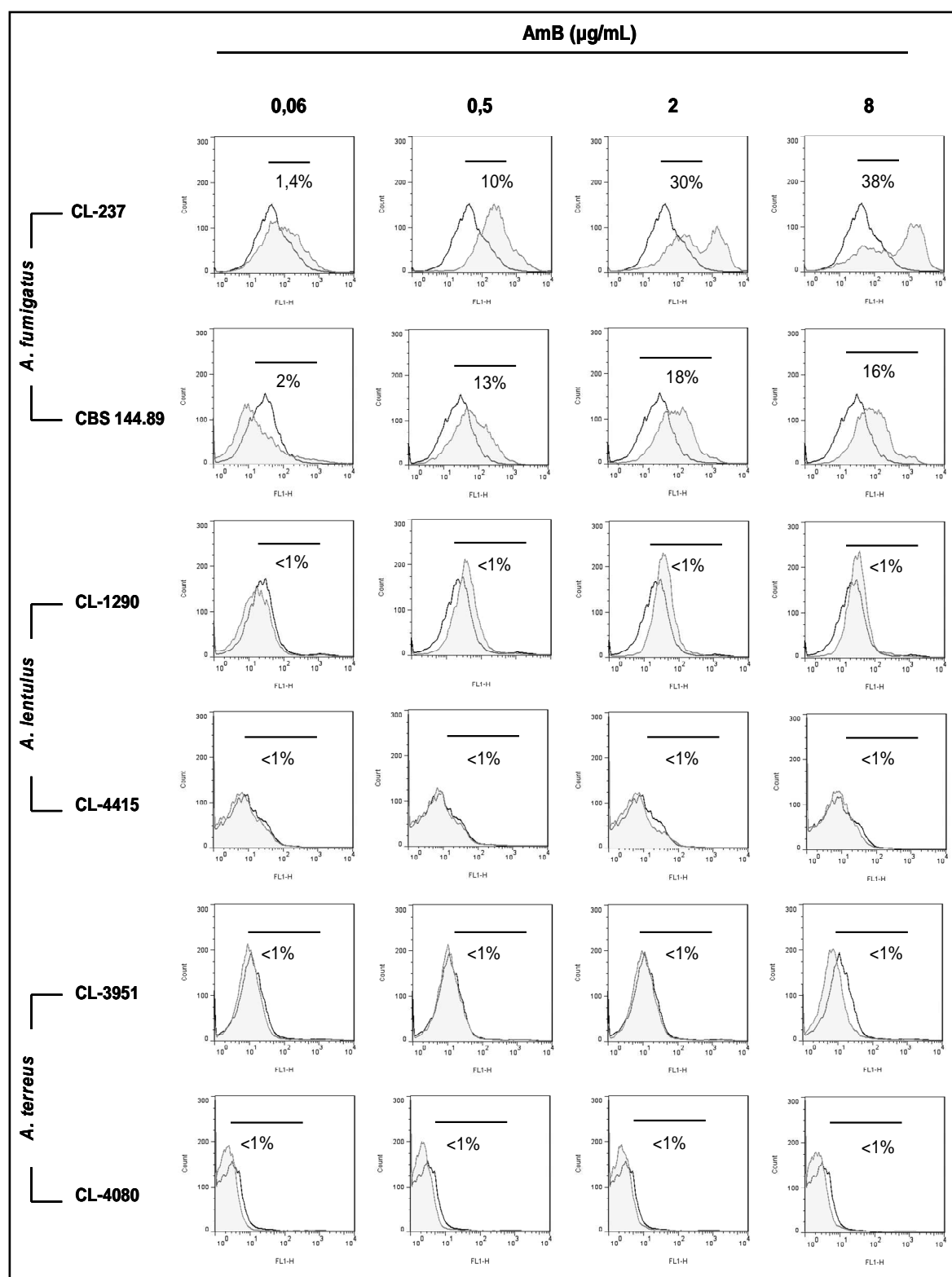


Figura 4.15. Acumulación de ROS medida por cambio en la intensidad de fluorescencia emitida por la DHF tras el tratamiento de cepas de *A. fumigatus* (CM-237 y CBS-144.89), *A. lentulus* (CM-1290 y CM-4415) y *A. terreus* (CM-3951 y CM-4080) con AmB (0, 0,06, 0,5, 2 ó 8 $\mu\text{g/mL}$) durante 3 h. Las células control (células sin tratamiento) se representan con el histograma en línea negra. En cada caso se indica el porcentaje de células en las que se detectó fluorescencia.

4.3.1.1. Crecimiento en fuentes de carbono fermentables y respiratorias

Candida tropicalis crece tanto en fuentes de carbono fermentables y respiratorias (no fermentables, como la glicerina o el etanol). En éstas últimas, la mitocondria es absolutamente necesaria para obtener energía. Por esta razón, estudiamos el crecimiento de las levaduras en fuentes de carbono fermentables (glucosa) y respiratorias (glicerol-etanol). El tiempo de duplicación medio de las cepas sensibles en glucosa fue de 3,41 mientras que el de las resistentes fue 5,33 h (Figura 4.16 A) indicando un retraso en el crecimiento en comparación con las primeras. En el medio suplementado con glicerol-etanol aunque el crecimiento fue limitado tanto en las cepas sensibles como en las resistentes, fue más evidente en las últimas, sugiriendo mayor dificultad de las cepas resistentes para utilizar sustratos en los que la mitocondria es totalmente requerida para obtener energía (Figura 4.16 B).

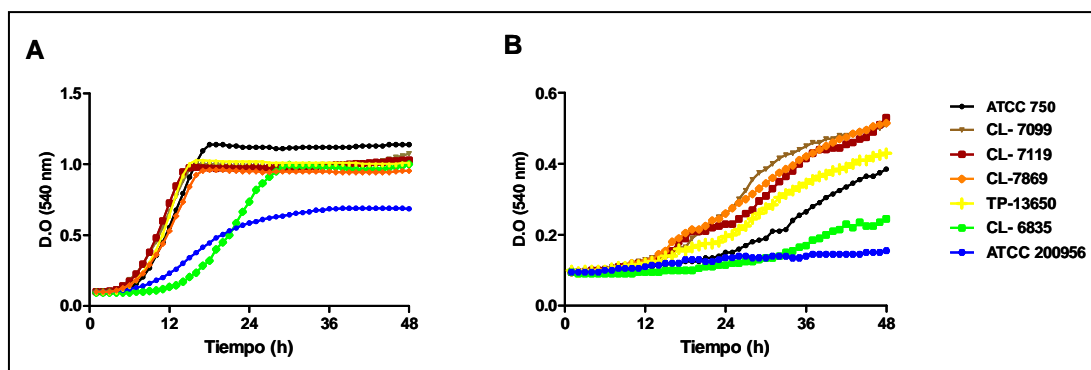


Figura 4.16. Crecimiento de las diferentes cepas de *C. tropicalis* en YNB suplementado con glucosa (A) y glicerol-etanol (B). El tamaño de inóculo fué de 10^5 levaduras/mL.

La diferencia en el crecimiento de las cepas sensibles en comparación con las resistentes en fuentes de carbono fermentables y respiratorias, fueron confirmados en medios sólidos conteniendo los mismos sustratos (Figura 4.17).

4.3.1.2. Evaluación del potencial de membrana mitocondrial

Ya que la producción de ROS ocurre principalmente en la mitocondria como subproducto de la cadena transportadora de electrones (Beckman y Ames, 1998), evaluamos el potencial de membrana mitocondrial como un indicador del estado energético y de integridad de la mitocondria. La generación de ATP en la mitocondria se da gracias a la cadena de electrones, que produce la salida de protones desde el complejo I, III y IV al espacio intermembrana creando un gradiente electroquímico y una diferencia en el potencial de membrana. De esta manera, se induce la internalización de los

protones a favor de gradiente a través del complejo V (ATP sintasa), el cual utiliza la energía de este gradiente para sintetizar ATP.

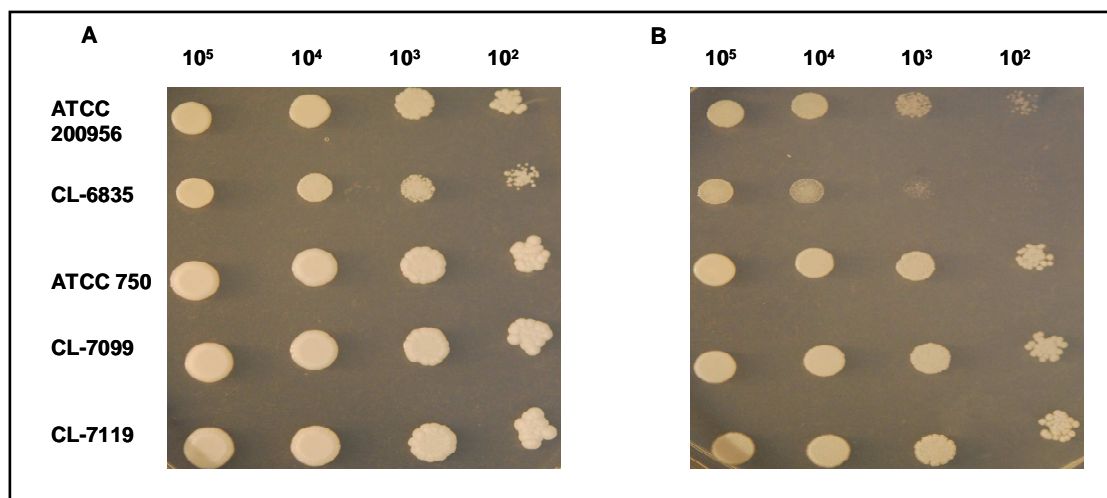


Figura 4.17. Crecimiento de *C. tropicalis* en YNB suplementado con glucosa (2%) (A) y YNB suplementado con glicerol (3%)-etanol (2%) (B), tras incubación a 35°C durante 48 h. El crecimiento de las cepas resistentes (ATCC 200956 y CL-6835) a AmB fue limitado en ambos medios pero fue más evidente en el medio respiratorio (B).

Cambios en el $\Delta\psi_m$ pueden detectarse utilizando las sondas lipofílicas-catiónicas Rodamina 123 y Mitotracker Green, las cuales se acumulan en la mitocondria de una manera dependiente del potencial de membrana. Las cepas resistentes a AmB incorporaron más Rodamina 123 (Figura 4.18 A) y MitroTracker Green (Figura 4.18 B) que las cepas sensibles y que la resistente a los azoles ($p < 0,05$). Este resultado sugiere que en las cepas resistentes a AmB hay una alteración basal en el $\Delta\psi_m$.

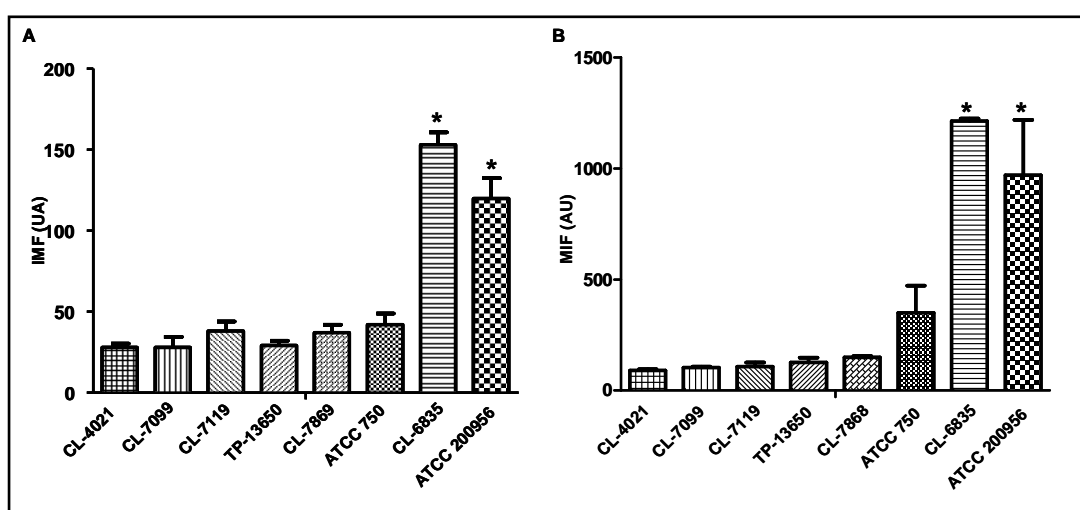


Figura 4.18. Intensidad media de fluorescencia (IMF), en unidades arbitrarias (UA), de cepas de *C. tropicalis* con diferentes perfiles de susceptibilidad en presencia de las sondas Rodamina 123 (A) o MitroTracker Green (B). Los resultados corresponden a la MD \pm DE de experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

4.3.1.3. Estudio de la estructura mitocondrial

Los resultados descritos en los apartados anteriores sugieren que las cepas resistentes a AmB presentaban diferencias en la función mitocondrial. Por ello, decidimos realizar un estudio morfológico de las mitocondrias en estas cepas. De esta manera, calculamos el número de mitocondrias, por plano observado, en diferentes células de cada cepa así como el volumen a partir de imágenes obtenidas con un microscopio electrónico de transmisión (MET). La diferencia en el número de mitocondrias entre las levaduras de cepas sensibles y resistentes no fue estadísticamente significativa ($p > 0,05$). Además, se calculó el volumen de las mitocondrias a partir de la medida del largo y el ancho de cada organela. Tal y como se muestra en la Figura 4.19 no hubo diferencia significativas entre las cepas de *C. tropicalis*, excepto en la cepa ATCC 200956, donde observamos mayor volumen mitocondrial ($p < 0,05$).

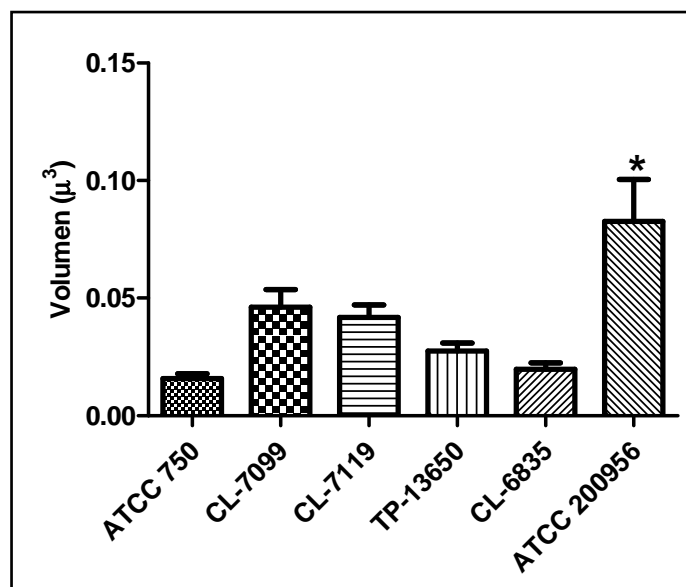


Figura 4.19. Promedio del volumen mitocondrial de levaduras de las diferentes cepas de *C. tropicalis*. Los resultados corresponden a la MD \pm DE de los datos obtenidos de la medición de mínimo 60 mitocondrias por cepa. El asterisco indica diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) determinada por una de las cepas resistentes a AmB.

4.3.2. Otras características celulares

4.3.2.1. Tamaño de las levaduras y ancho de la pared

Además de características mitocondriales, también observamos que las cepas resistentes a AmB presentaban otras alteraciones morfológicas. En experimentos previos, habíamos observado que las células de la cepa ATCC 200956 tenían mayor tamaño que el resto de las cepas (resultado no mostrado) por lo que partiendo de imágenes obtenidas

por MET se calculó el tamaño medio de mínimo 60 levaduras por cepa. Como se muestra Figura 4.20 las levaduras de la cepa ATCC 200956 son de mayor tamaño que las de otras cepas ($p < 0,05$).

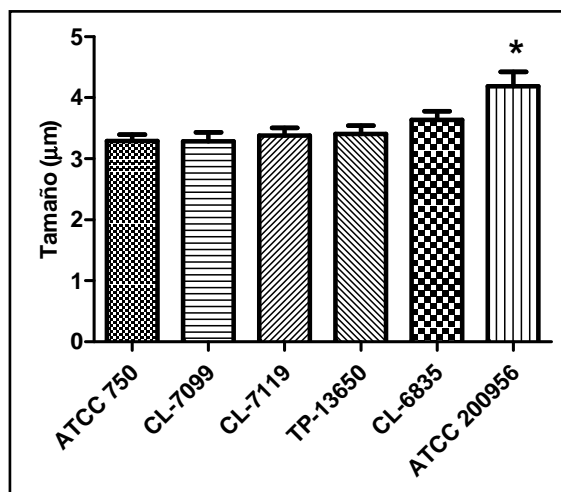


Figura 4.20. Tamaño de blastoconidias de diferentes cepas de *C. tropicalis* obtenido por la medición del diámetro de 20 levaduras de cada cepa. El asterisco indica diferencia significativa ($p < 0,05$) de la cepa ATCC 200956 con respecto a las demás.

Algunos cambios en la pared fúngica se han relacionado con resistencia a AmB (Seo y col., 1999). Por ello, analizamos el grosor de esta estructura en cepas de *C. tropicalis* con diferente perfil de sensibilidad a AmB. Como se muestra en la Figura 4.21 E y F, las cepas resistentes a AmB tenían una pared celular de mayor grosor que el resto de la cepas.

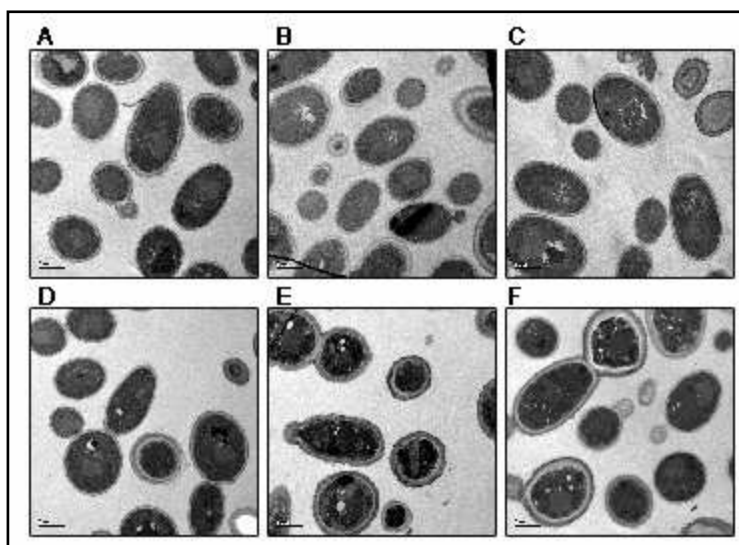


Figura 4.21. Imágenes obtenidas por MET de las diferentes cepas de *C. tropicalis*. A) ATCC 750, B) CL-7099 C) CL-7119, D) TP-13650, E) CL-6835, F) ATCC 200956. La barra de escala representa 2 µm.

La diferencia en el grosor de la pared se muestra en la Figura 4.22 con imágenes representativas de cepa de *C. tropicalis* usando MET.

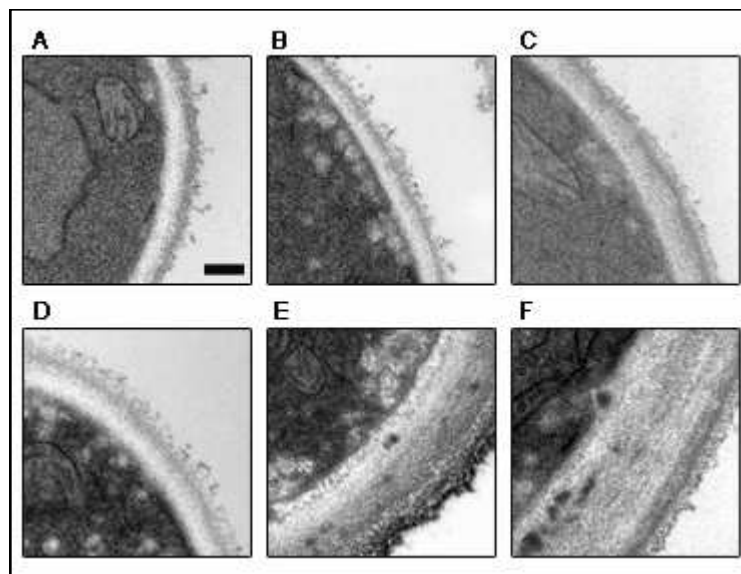


Figura 4.22. Imágenes del grosor de la pared en levaduras de las diferentes cepas de *C. tropicalis* captadas por MET: A) ATCC 750, B) CL-7099 C) CL-7119, D) TP-13650, E) CL-6835, F) ATCC 200956. La barra de escala representa 2 μm .

Para cuantificar las diferencias observadas, medimos el grosor de la pared celular (μm) en las imágenes obtenidas por MET (Figura 4.23 A). Aunque este parámetro fue variable entre células dentro de cada cepa, en las cepas resistentes a la AmB, fue significativamente mayor ($p < 0,05$). Estos resultados además estuvieron de acuerdo con los obtenidos al calcular el porcentaje del volumen de la pared con respecto al volumen total de la célula (Figura 4.23 B).

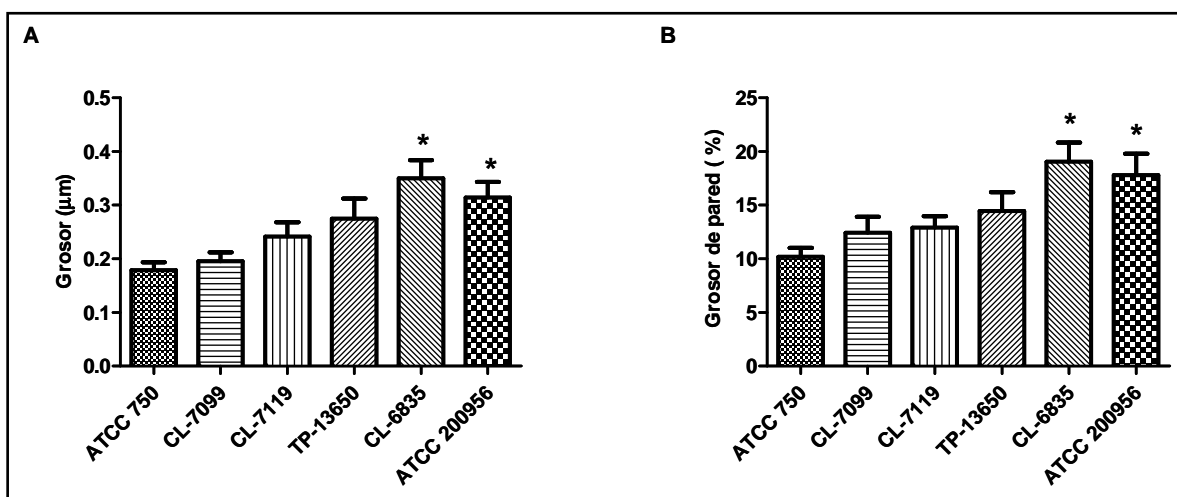


Figura 4.23. Grosor (μm) de la pared celular de levaduras de cepas de *C. tropicalis* (A), porcentaje del volumen de la pared con respecto al volumen total de la célula (B). Las medidas se realizaron en imágenes captadas con un MET. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre el grosor de la pared celular de las levaduras resistentes a AmB en comparación con el de las sensibles.

4.3.2.2. Detección de β -1,3-glucanos

Uno de los principales componentes de la pared celular de los hongos son los β -1,3-glucanos. Con el fin de estudiar si el engrosamiento de la pared en las cepas de *C. tropicalis* resistentes a AmB estaba relacionado con el cambio en el contenido de β -1,3-glucanos, se utilizó un anticuerpo monoclonal contra el polisacárido y, como secundario, un anticuerpo marcado con Alexa Fluor® 488.

Como se muestra en la Figura 4.24, la fluorescencia de las cepas resistentes a la AmB fue significativamente mayor que la de las cepas sensibles, lo que indica una mayor cantidad de β -1,3-glucanos en las cepas resistentes en comparación con las sensibles. Además, las células fueron analizadas con un citómetro de flujo para cuantificar la intensidad media de fluorescencia (IMF; Tabla 4.3).

Tabla 4.3. Intensidad media de fluorescencia (IMF) emitida por los β -1,3-glucanos de levaduras de *C. tropicalis* detectados con un anti-anticuerpo marcado con Alexa Fluor® 488.

Cepa	IMF (MG)
ATCC 750	52,9
CL-7099	88,2
CL-7119	70,6
TP-13650	74,2
CL- 6835	113
ATCC 200956	116

4.3.2.3. Crecimiento en rojo Congo

A continuación, nos propusimos evaluar si la estabilidad de la pared en las diferentes cepas estaba afectada, para lo que investigamos como afectaba el rojo Congo el crecimiento de las levaduras. Este compuesto interfiere con la correcta construcción de la pared a través de la unión a la quitina (Ram y Klis, 2006). El rojo congo inhibió el crecimiento de Las cepas sensibles a AmB a concentraciones de 50 y 100 μ g/mL. Sin embargo, las cepas resistentes a AmB fueron viables en las mismas condiciones.

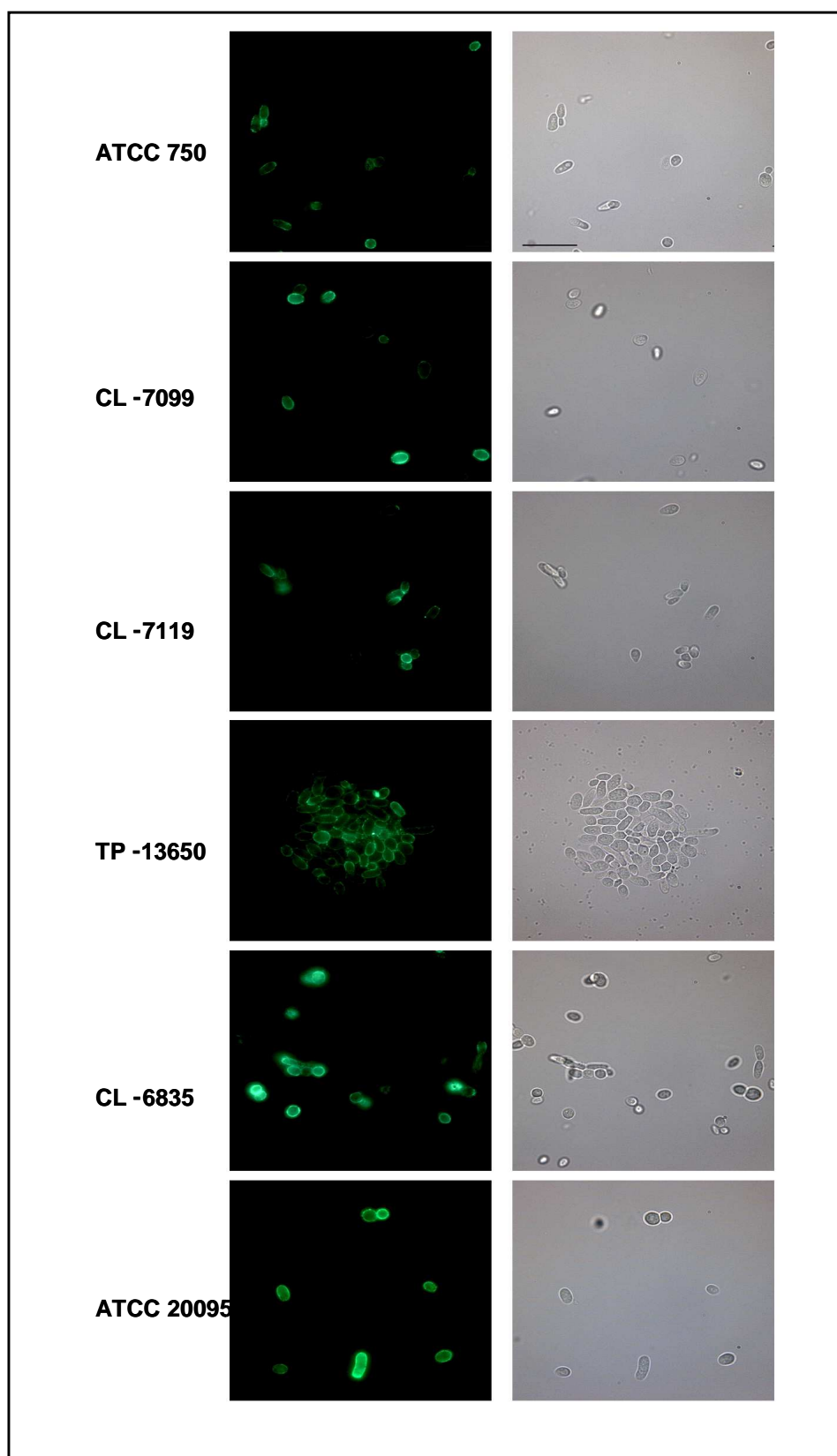


Figura 4.24. Imágenes de la fluorescencia emitida por las levaduras de cepas de *C. tropicalis* con diferentes perfiles de susceptibilidad como resultado de la detección de β -1,3-glucanos por inmunofluorescencia indirecta utilizando un anti-anticuerpo marcado con Alexa Fluor ® 488.

El efecto de este compuesto fue dependiente de la temperatura; a 37°C el crecimiento de todas las cepas se inhibió (Figura 4.25). Simultáneamente, las cepas fueron cultivadas en Sabouraud como control de crecimiento.

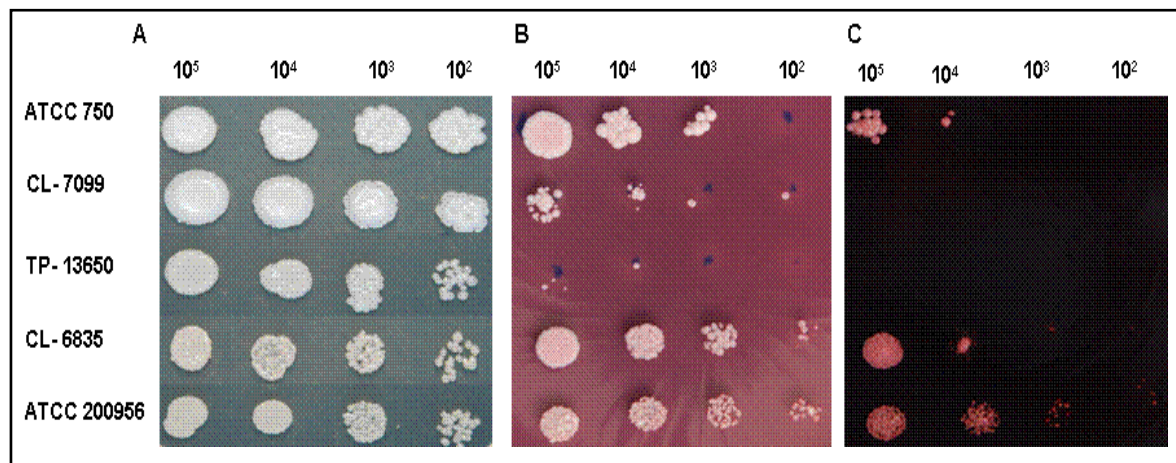


Figura 4.25. Crecimiento de diferentes cepas de *C. tropicalis* en Sabouraud (A), Sabouraud con rojo Congo 50 µg/mL (B) ó rojo Congo 100 µg/mL (C). Los cultivos fueron incubados a 30°C durante 48 h.

4.4. Relación entre ergosterol y resistencia a anfotericina B

El mecanismo clásico de resistencia descrito para AmB es la ausencia de ergosterol en la membrana celular. Sin embargo, también se han descrito casos de resistencia a AmB en los que no hay alteraciones en el contenido de ergosterol. Aunque los resultados de nuestro trabajo claramente permiten establecer una relación entre disminución en la producción de ROS con la resistencia a AmB, consideramos importante analizar el perfil de esteroides en cepas de *C. tropicalis* y *Aspergillus* spp. con diferentes perfiles de sensibilidad a antifúngicos. El perfil de esteroides se obtuvo utilizando CG-EM. En las cepas de *C. tropicalis* se identificaron 22 esteroides que se detallan en la Tabla 4.4.

El ergosterol fue el esteroide más abundante en las cepas ATCC 750 y TP-13650, por el contrario, en las cepas ATCC 200956 y CL-6835 no se detectó cantidad alguna de ergosterol (Figura 4.26 A).

Los metabolitos fueron agrupados de acuerdo a la presencia del grupo metil sobre el átomo de carbono 14 y se encontró una acumulación estadísticamente significativa (* $p < 0,0001$) de esteroides 14- α -metilados en las cepas ATCC 200956 y CL-6835 (ambas resistentes a AmB y azoles) (Figura 4.26 B).

Tabla 4.4. Composición relativa de esteroides de cepas de *Candida tropicalis*

Esteroides y compuestos relacionados		Cepa			
Nombres sistemáticos	Nombre común	ATCC 750	ATCC 200956	CL-6835	TP-13650
1 Escualeno		8,54	0,17	1,45	ND
2 24-metilcolesta-5,7,9(11),22-tetraen-3 β -ol	Neoergosterol	0,15	ND	ND	ND
3 S28:3		0,08	ND	ND	ND
4 Colesta-8,24-dien-3 β -ol	Zimosterol	8,97	ND	ND	20,60
5 14 α -metilcolesta-8,24-dien-3 β -ol		ND	0,11	0,07	ND
6 24-metilcolesta-5,7,22-trien-3 β -ol	Ergosterol	64,96	ND	ND	60,84
7 24-metilcolesta-7,22-dien-3 β -ol		0,20	ND	ND	0,51
8 24-metilcolesta-5,7,22,24(28)-tetraen-3 β -ol		0,81	ND	ND	5,20
9 14 α ,24-di metilcolesta -8,24(28)-dien-3 β -ol	14 Metil fecosterol	ND	61,08	52,67	ND
10 24- metilcolesta -8,24(28)-dien-3 β -ol	Fecosterol	1,91	ND	ND	2,31
11 4 α ,14 α -dimetilcolesta -8,24-dien-3 β -ol		0,12	1,64	0,63	ND
12 4 α -S28:2		ND	ND	ND	0,21
13 24- metilcolesta -5,7,24(28)-trien-3 β -ol		2,56	ND	ND	3,43
14 24- metilcolesta -5,7-dien-3 β -ol		4,11	ND	ND	2,23
15 24- metilcolesta -7,24(28)-dien-3 β -ol	Episterol	4,45	ND	ND	2,06
16 24- metilcolesta 7-en-3 β -ol		ND	ND	ND	0,03
17 4,4,14 α -trimetilcolesta-8,24-dien-3 β -ol	Lanosterol	2,32	25,80	27,75	1,83
18 4 α ,24-dimetilcolesta-8,24(28)-dien-3 β -ol		0,11	ND	ND	ND
19 4,4-dimetilcolesta-8,24(28)-dien-3 β -ol		0,53	ND	ND	0,65
20 4,4,14,24-tetrametilcolesta-8,24(28)-dien-3 β -ol	Eburicol	0,15	8,68	17,42	0,10
21 No identificado		ND	2,51	ND	ND
22 4,4,24-trimetilcolesta-8,24(28)-dien-3 β -ol		0,03	ND	ND	ND

En negrita se señalan los compuestos que se acumularon en las cepas con resistencia cruzada a AmB y azoles. ND: no detectado.

Los esteroides 14- α -metilados identificados fueron 14 α -metilfecosterol, lanosterol y eburicol. Estos no se observaron en las cepas ATCC 750 ni en la TP- 13650. La acumulación de 14 α metilfecosterol en lugar de 14- α metil-3,6-diol permite a la célula continuar el crecimiento a pesar de la presencia de la AmB y/o de azoles (Watson y col., 1989).

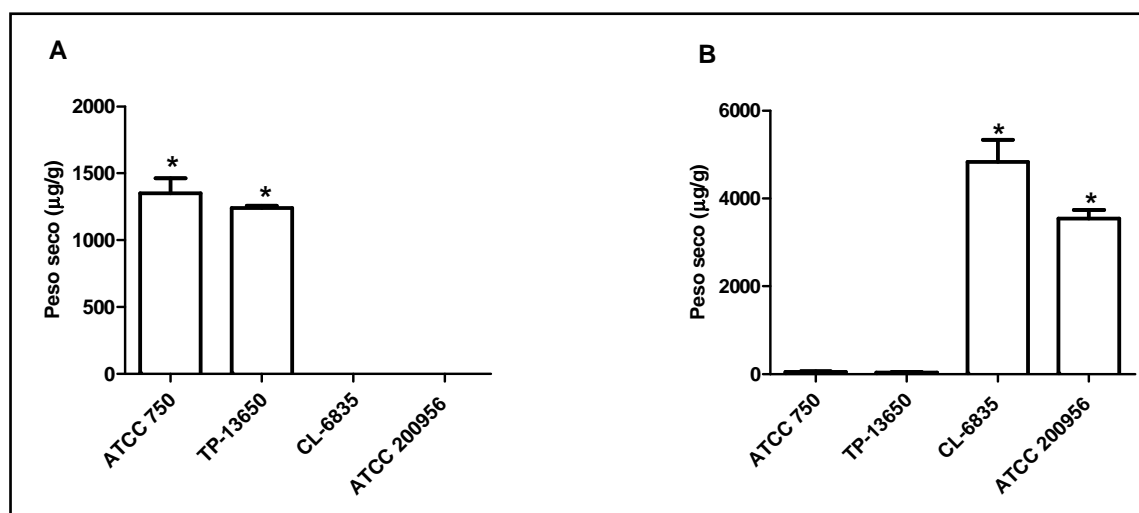


Figura 4.26. Cantidad total de ergosterol (A) y de C-14metil esteroides (B) en cepas de *C. tropicalis*. Ergosterol es el esteroide más abundante en las cepas sensibles a AmB (ATCC 750 y TP-13650) (A). En las cepas resistentes a AmB (ATCC 200956 y CL-6835) son los esteroides 14- α -metilados (* $p < 0,05$).

En el análisis de los esteroides en cepas de *A. fumigatus* (CM-237) y *A. lentulus* (CM-1290 y 4415) se identificaron 21 esteroides siendo el ergosterol el más abundante en todas las cepas (Tabla 4.5). En este caso no se observaron diferencias significativas entre el tipo y la cantidad relativa de esteroides entre las cepas a pesar de la diferencia en el perfil de susceptibilidad ($p > 0,05$).

Tabla 4.5. Composición relativa de esteroides en *A. fumigatus* y *A. lentulus*

Esteroides y compuestos relacionados		Cepa		
Nombre sistemático	Nombre común	CM-237	CM-1290	CM-4415
1 Escualeno		ND	0,95	0,17
2 Colest-5-en-3 β -ol		ND	0,11	0,15
3 24-metilcolesta-5,8,22-trien--3 β -ol		2,31	1,64	1,76
4 24-metilcolesta-5,7,9,22-tetraen--3 β -ol	Neoergosterol	0,01	0,01	0,01
5 24-metilcolesta-5,7,22- trien--3 β -ol	Ergosterol	75,44	87,03	86,17
6 24-metilcolesta-7,22-dien--3 β -ol		2,34	2,5	2,75
7 S28:4 (unknown)		0,24	0,10	0,14
8 24-metilcolesta-5,7,22,24 (28)- tetraen--3 β -ol		0,36	0,40	0,34
9 24-metilcolesta-8,24 (28)- dien-3 β -ol	Fecosterol	0,09	0,10	0,11
10 24-metilcolesta-7,22,24 (28)- trien-3 β -ol		0,46	0,32	0,36
11 24-metilcolesta-5,7,24 (28)- trien-3 β -ol		0,55	0,61	0,30
12 24-metilcolesta-5,7-dien-3 β -ol		0,72	0,67	0,44
13 24-metilcolesta-7,24 (28)- -dien-3 β -ol	Episterol	2,12	1,40	1,52
14 24-etilcolesta-5,7,22-trien-3 β -ol		9,78	1,18	3,84
15 4 α ,4 β ,14-trimetilcolesta-8,24-dien-3 β -ol	Lanosterol	0,75	0,59	0,27
16 4 α ,24-dimetilcolesta-8,24(28)-dien-3 β -ol		1,26	0,778	1,06
17 4 α ,4 β ,14,24-tetrametilcolesta-8,24(28)-dien-3 β -ol	Euburicol	1,06	0,89	0,12
18 4 α ,24-dimetilcolesta-7,24(28)-dien-3 β -ol		0,40	0,32	0,31
19 S30:2 (unknown)		0,03	0,02	0,01
20 S30:3 (unknown)		0,14	0,14	0,03
21 4 α ,4 β ,24-trimetilcolesta--8,24(28)—dien-3 β -ol		1,93	1,2	0,31

4.5. Resistencia cruzada entre azoles y anfotericina B

La resistencia cruzada a AmB y azoles en levaduras es menos frecuente que la resistencia solo a los azoles. Dado que en este trabajo se utilizaron cepas de *C. tropicalis* con diferentes perfiles de susceptibilidad (sensibles a todos los antifúngicos, resistente a los azoles o resistentes a ambos AmB y azoles), quisimos investigar los mecanismos de resistencia a los azoles y su relación con la resistencia cruzada con AmB.

4.5.1. Amplificación y secuenciación de los genes *ERG11* y *ERG3*

La ausencia de ergosterol en las cepas de *C. tropicalis* resistentes a AmB y el hecho de que estas cepas, además, eran resistentes a los azoles, nos llevó a plantearnos estudiar dos genes importantes en la vía de síntesis de ergosterol: *ERG11* y *ERG3*. El primero codifica la 14- α esterol demetilasa, diana de los azoles. En *C. albicans* se han descrito numerosas mutaciones en este gen.

En algunos casos se ha podido asociar una mutación puntual con la resistencia a los azoles por una disminución de afinidad de estos por la diana. Por otro lado, *ERG3* codifica la $\Delta 5,6$ esterol desaturasa, enzima clave en la síntesis del ergosterol y cuyas mutaciones se han asociado a resistencia cruzada entre AmB y azoles (Morio y col., 2012).

4.5.2. Análisis de la secuencia del gen *ERG11*

En la secuencia del gen *ERG11* de la cepa ATCC 750 no se observaron cambios con respecto a la secuencia, de la misma cepa, previamente depositada en el GenBank (M23673). Sin embargo, la secuencia de la cepa ATCC 200956 reveló una delección de 132 pares de bases, que se corresponden con la ausencia de 44 aminoácidos ($\Delta 276-319$) localizados dentro de la hélice I de la proteína Erg11p. Además, esta delección ocasionaba la sustitución de un aminoácido (D275V) al reinstaurarse el marco de lectura.

El análisis de la secuencias de las cepas CL-6835 y TP-13650 mostró mutaciones que llevaron a sustituciones de aminoácidos G464D y Y132F, respectivamente. En estas cepas, también se identificaron otros polimorfismos con respecto a la secuencia control (M23673) que no se correspondieron con ningún cambio de aminoácidos (Tabla 4.6).

Candida tropicalis es una levadura diploide, por ello, realizamos una amplificación por PCR, utilizando dos combinaciones de iniciadores, en la que cada una de las

combinaciones tenía un oligonucleótido diseñado dentro de la secuencia delecionada (Figura 4.27).

La ausencia de amplificación mostró que la secuencia delecionada estaba ausente en los dos alelos, indicando que la cepa ATCC 200956 era homocigoto para esta deleción en el *ERG11* (Figura 4.28).

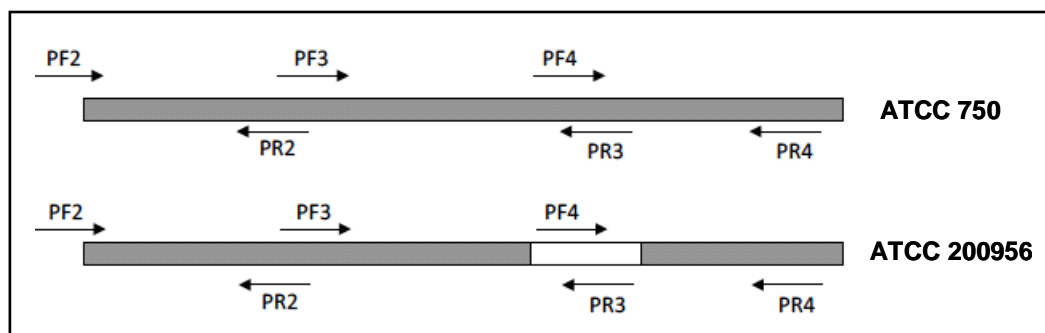


Figura 4.27. Esquema de la localización de los iniciadores directo y reverso (PF3+ PR3, PF4 + PR4) (Tabla 3.2) que se utilizaron para amplificar al región específica del gen *ERG11* donde se localizó la deleción.

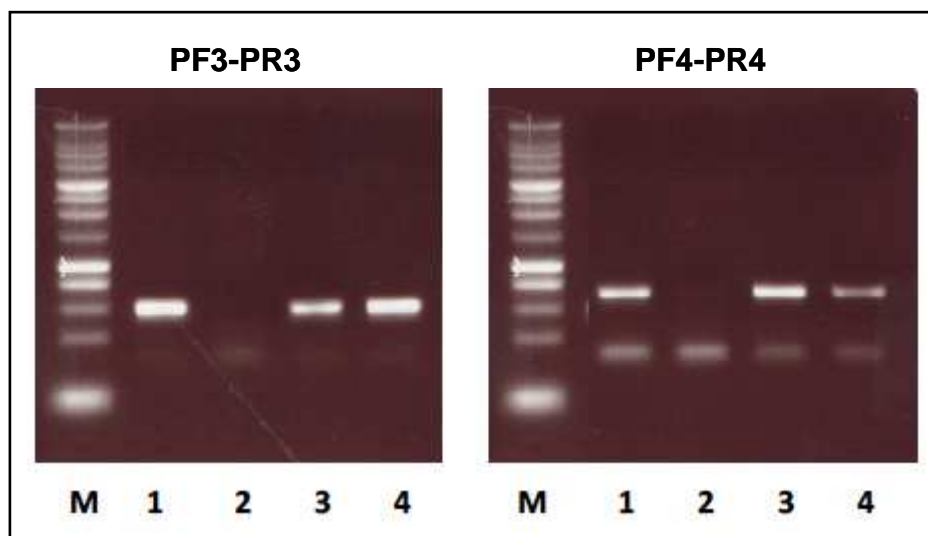


Figura 4.28. Electroforesis en gel de agarosa de productos amplificados por PCR con los iniciadores directo y reverso. Línea 1: ATCC 750, línea 2: ATCC 200956, línea 3: CL-6835 y línea 4: TP-13650. M: Marcador de peso molecular (1 kb).

Como el resultado consistía en una PCR de amplificación negativa, el DNA de la cepa ATCC 200956 fue amplificado con los iniciadores PF2 y PR4 como control positivo (resultados no mostrados).

La comparación de las secuencias de Erg11p con las de otros hongos depositadas en GenBank, incluyendo levaduras y hongos filamentosos, confirmó la presencia de mutaciones en residuos muy conservados en todos ellos (Figura 4.29).

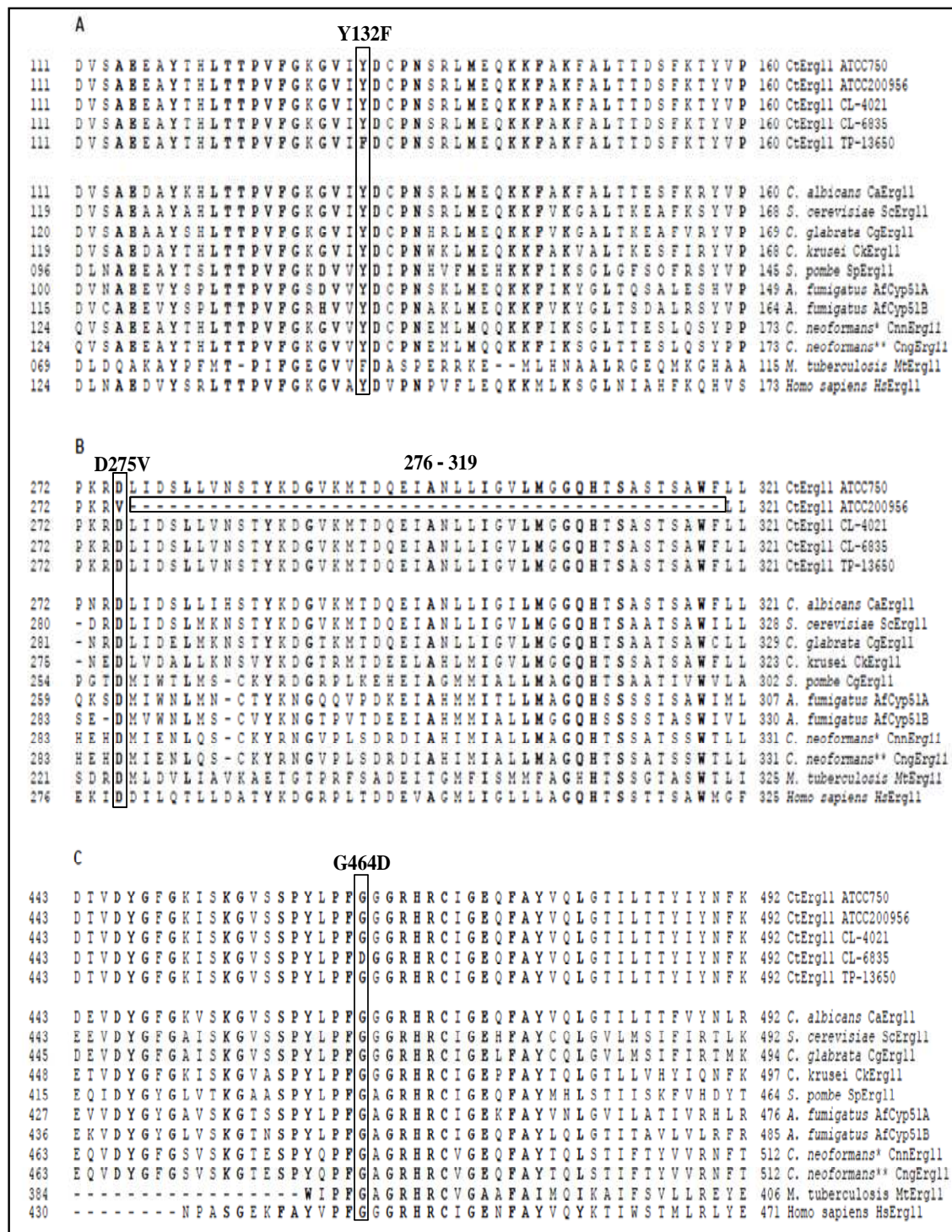


Figura 4.29. Alineamiento parcial de las secuencias de aminoácidos de los genes *ERG11/CYP51* de levaduras y hongos filamentosos, respectivamente. Los aminoácidos fueron alineados con el software Lasergene 8.1 (Enastar, Inc; Madison, Wis, USA). (A) *C. tropicalis* TP-13650 con la sustitución Y132F; (B) *C. tropicalis* ATCC 200956 con la delección $\Delta 274$ -319 y la sustitución D275V; (C) *C. tropicalis* CL-6835 con la sustitución G464D. Las letras en negrita indican aminoácidos conservados.

Tabla 4.6. Mutaciones en los genes *ERG3* y *ERG11* cambio de amino ácidos en las enzimas Erg11p y Erg3p en cepas de *C. tropicalis*.

Cepas	Tratamiento previo de los pacientes	Análisis de las secuencias			
		$\Delta 5,6$ esterol desaturasa ERG3 bp	ERG3 aa	14 α esterol demetilasa ERG11 pb	ERG11 aa
ATCC 750	Desconocido	g366a	R122R		-
ATCC 200956	Desconocido	c773t	S258F	$\Delta 824-955$ g1362a t1554c	$\Delta 276-319$ D275V K454K I517I
CL-6835	FCZ, VCZ y CAS	a334g g366a t637c	S113G R122R L212L	t912c g1391a	I304I G464D
TP-13650	FCZ y VCZ			t225c g264a a395t t783c g1363a t1554c	C75C L88L Y132F I261I K454K I517I

FCZ, fluconazol; VCZ; voriconazol; CAS, caspofungina; pb, pares de bases; aa, aminoácidos. En negrita se señalan las mutaciones con cambio de aminoácidos en la proteína.

4.5.3. Análisis de la secuencia del gen *ERG3*

La secuencia de nucleótidos completa del gen *ERG3* de *C. tropicalis* MYA-3404, se utilizó como cepa de referencia (GenBank XM002550136) para el análisis de nuestras secuencias del *ERG3*. La secuenciación de este gen en las cepas ATCC 200956 y CL-6835 permitió la identificación de mutaciones que llevaron a sustitución de aminoácidos S258F (c773t) y S113G (a334g), respectivamente. Además en la cepa CL-6835 se encontraron dos mutaciones puntuales (t637c y g366a) que no afectaron las secuencias de aminoácidos. En las cepas ATCC 750 y TP-13650 no se observaron mutaciones con respecto a la secuencia *ERG3* de referencia (MYA-3404; Tabla 4.6 Tabla 4.6).

4.5.4. Evaluación de la activación de bombas de flujo en *C. tropicalis*

La rodamina 6G es un sustrato fluorescente de proteínas de la superfamilia de transportadores MDR (*multidrug resistance*), que ha sido utilizado para evaluar la actividad de este tipo de proteínas en aislamientos de *C. albicans* resistentes a azoles (Maesaki y col., 1999). En *C. tropicalis* la acumulación/flujo de la R6G no varió en ninguna de las cepas estudiadas, independiente del perfil de sensibilidad (Figura 4.30). Estos resultados indican que la activación de bombas, no contribuyó a la resistencia antifúngica en las cepas estudiadas en este trabajo. La intensidad media de fluorescencia (IMF) de las cepas en las que se evaluó la actividad de bombas de flujo en *C. tropicalis* se muestra en la Tabla 4.7. La IMF se determinó en un periodo de incubación inicial y

después de una segunda incubación y lavados con PBS (final) (ver Materiales y Métodos).

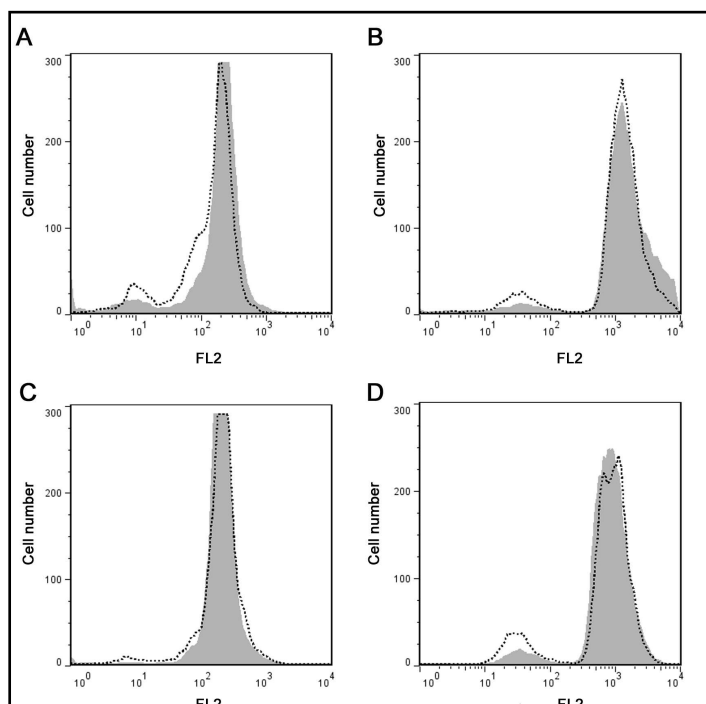


Figura 4.30. Histogramas del análisis del influjo/flujo de la Rodamina 6G en las siguientes cepas de *C. tropicalis*: A) sensible a todos los antifúngicos (ATCC 750); C) resistente únicamente a los azoles (TP-13650); B y D resistentes a azoles y AmB (ATCC 200956 y CL-6835, respectivamente). La línea negra corresponde a la fluorescencia emitida por las levaduras incubadas durante 30 min con la (R6G) y posterior lavado con PBS. El área gris, a la fluorescencia emitida después de 15 min adicionales de incubación en YEPD fresco suplementado con glucosa 1%).

Aunque se demostró que no había diferencia en la captación y eliminación de la rodamina entre las cepas, se observó mayor IMF en las cepas con resistencia cruzada posiblemente como consecuencia del cambio en la composición de los lípidos de membrana de estas cepas.

Tabla 4.7. Intensidad media de fluorescencia de las diferentes cepas de *C. tropicalis* tratadas con Rodamina 6G

Cepa	IMF inicial (MG \pm DE)	IMF final (MG \pm DE)
ATCC 750	239 \pm 28	139 \pm 37
ATCC 200956	1881 \pm 12	1.296 \pm 255
CL-6835	949 \pm 4	795 \pm 173
TP-13650	365 \pm 196	239 \pm 3

MIF; intensidad media de fluorescencia, MG; Media Geométrica, DE; Desviación estándar.

4.6. Evaluación de la virulencia y respuesta antifúngica en el modelo alternativo: *Galleria mellonella*

Aunque los modelos mamíferos continúan siendo la referencia en estudios de correlación *in vitro* - *in vivo*, existen limitaciones para su uso como es el elevado coste de los animales, su mantenimiento y los problemas éticos asociados a su uso. Lo anterior ha hecho necesario buscar alternativas dentro de las que se encuentra el lepidóptero *G. mellonella*. Uno de los objetivos de esta tesis fue evaluar la eficacia de antifúngicos en modelos de infección con hongos patógenos que presentan diferentes perfiles de sensibilidad antifúngica. Con este propósito, se eligió *G. mellonella* como modelo de huésped para el estudio de la correlación de la sensibilidad *in vitro* con la eficacia *in vivo* de diferentes antifúngicos. Para ello, se utilizaron cepas de *C. tropicalis* con diferentes perfiles de susceptibilidad así como cepas de *A. fumigatus* y *A. lentulus*. Aunque *G. mellonella* ya se ha utilizado para evaluar virulencia de *C. albicans*, *C. neoformans*, *A. fumigatus* y *Fusarium* spp., no ha sido validada para evaluar respuesta a antifúngicos durante la infección por *C. tropicalis* o de otras especies de *Aspergillus*. Por ello, en la primera parte de esta sección se estandarizaron los modelos de infección y se estudió la interacción de estos hongos patógenos con *G. mellonella*. Una vez establecidas las condiciones óptimas de infección, se procedió a evaluar la eficacia antifúngica.

4.6.1. Evaluación de la virulencia de *C. tropicalis* en *G. mellonella*

La virulencia de *C. tropicalis* en *G. mellonella* se evaluó con cepas de diferentes perfiles de susceptibilidad, utilizando diferentes concentraciones de inóculo e incubando las larvas a diferentes temperaturas (30 y 37°C). La capacidad de *C. tropicalis* de producir infección fue dependiente de la cepa, del tamaño del inóculo y de la temperatura de incubación de las larvas. *Candida tropicalis* fue más virulenta cuando, tras la infección, las larvas se incubaron a 37°C que cuando se incubaron a 30°C. Cuando realizamos la incubación a 30°C, con los inóculos más bajos (5×10^5 y 10^6 levaduras/larva) la mortalidad fue menor del 40% con todas las cepas al cabo de 10 días (0 A y C). Sin embargo, a 37°C el 50% de mortalidad de las larvas inoculadas con las cepas ATCC 750, CL-7119 y CL-7868 se observó a los 8 ± 1 y 6 ± 1.4 días (5×10^5 y 10^6 levaduras/larva, respectivamente) (0 B y D).

La mortalidad causada por la cepa ATCC 200956 fue inferior a las demás a ambas temperaturas y con los mismos inóculos (0 A, B, C y D). Cuando *G. mellonella* se infectó con un inóculo mayor (2×10^6 levaduras/larva) de las cepas ATCC 750, CL-7119 y CL-7868, el tiempo medio en el que se observó la muerte del 50% de las

lavas disminuyó a las dos temperaturas (4 ± 1.4 y 2.5 ± 0.7 a 30°C y 37°C , respectivamente) en comparación con las infectadas con concentraciones de inóculo inferiores.

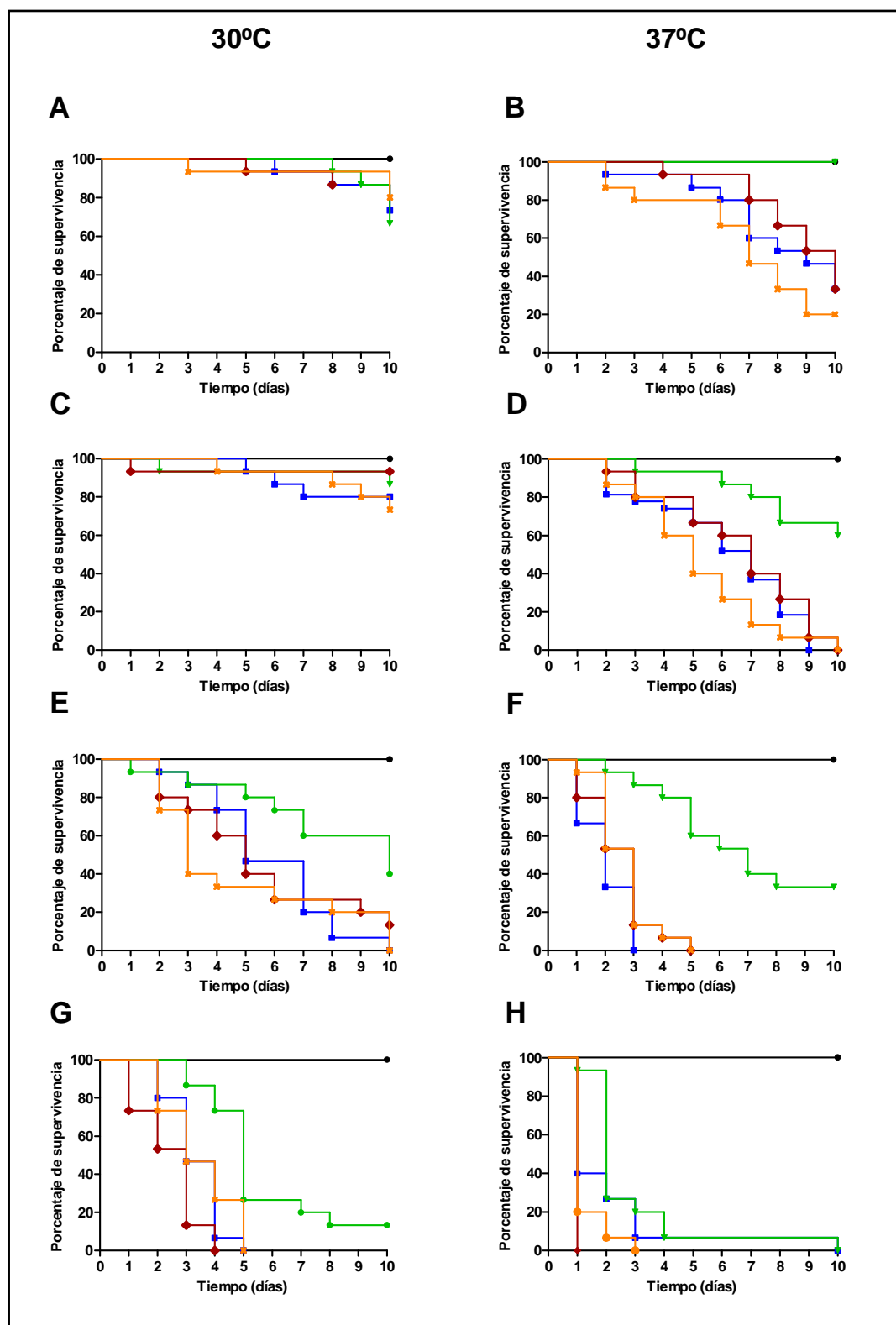


Figura 4.31. Curvas de supervivencia de *Galleria mellonella* infectadas con diferentes inóculos y cepas de *C. tropicalis* a 30°C y 37°C . A y B (2×10^5), C y D (10^6), E y F (2×10^6), G y H (4×10^6) levaduras/larva. ATCC 750 (azul), ATCC 200956 (verde), CL-7119 (rojo) y CL-7886 (naranja). Larvas inoculadas con PBS (negro).

Con esta concentración de inóculo, así como se había observado con los inóculos mas bajos (5×10^5 y 10^6 levaduras/larva), la cepa ATCC 200956 fue poco virulenta observándose la muerte del 50% de las larvas al día 10 a 30°C y 7 días a 37°C (0 E y F). Con el inóculo mayor (4×10^6) la muerte del 50% de las larvas con todas las cepas ocurrió entre los días 3-5 a 30°C y 1-3 días a 37°C (0 G y H). En los experimentos iniciales se incluyeron grupos de larvas pinchadas, pero no inyectadas, para descartar muerte por trauma, no observándose muerte en estos casos. Los grupos de larvas no inoculadas o inoculadas con 10 μL de PBS-ampicilina siempre se incluyeron como controles aunque estos grupos solo se representan en algunos experimentos para facilitar la visualización de los resultados.

Para confirmar que la muerte de las larvas infectadas con *C. tropicalis* era producida por las levaduras y no por la inoculación de un alto número de partículas exógenas, se realizaron experimentos en las que las larvas fueron inoculadas con levaduras inactivadas por calor. Como se observa en la Figura 4.32 las células muertas no produjeron muerte en las larvas a diferencia de lo observado con el control ($p < 0,0001$), independiente de la temperatura de incubación de las larvas. Además se confirmó, mediante curvas de crecimiento, que la diferencia en la virulencia de la cepa a las dos temperaturas no estuviera determinada por diferencia en el crecimiento a las mismas temperaturas.

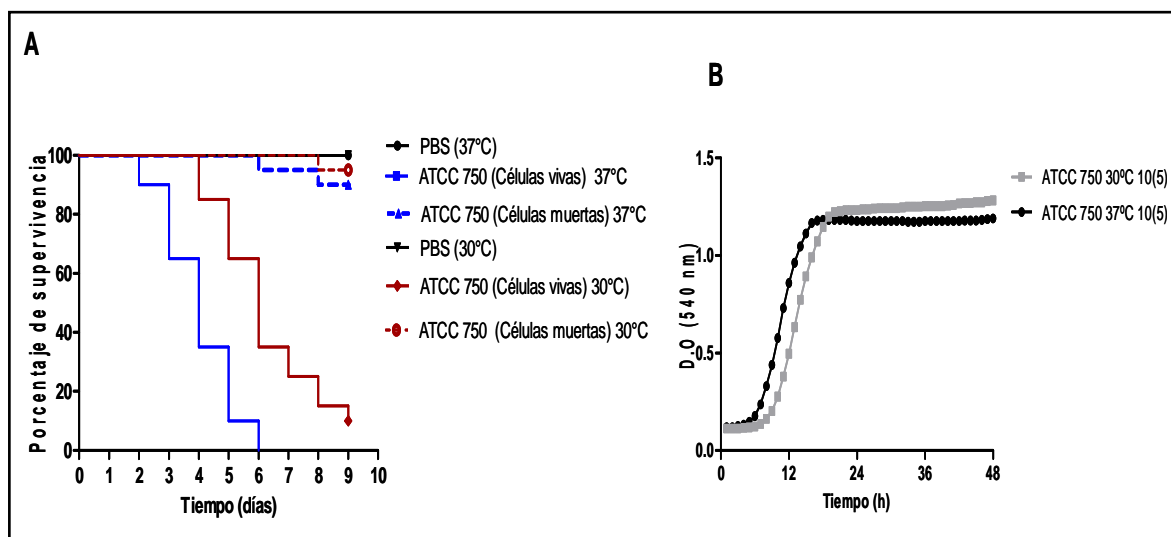


Figura 4.32. Supervivencia de larvas de *Galleria mellonella* inoculadas con células de *C. tropicalis* ATCC 750 (2×10^6 levaduras/larva) vivas o inactivadas a 60°C (A). Las larvas fueron incubadas 30°C y 37°C tras la infección. Se incluyeron grupos control inoculados con PBS a cada temperatura. Curvas de crecimiento a 30°C y 37°C de la cepas ATCC 750 a una concentración del inóculo de 10^5 (B).

4.6.1.1.1. Melanización de las larvas de *G. mellonella* tras la infección con *C. tropicalis*

La producción de melanina en *G. mellonella* es un signo de respuesta temprana a un agente infeccioso o a un cuerpo extraño. Por ello examinamos si *C. tropicalis* inducía esta respuesta al ser inoculada en las larvas. Como se muestra en la Figura 4.33, *C. tropicalis* indujo la producción de melanina la cual fue detectada en la hemolinfa. La producción de melanina fue un proceso más rápido en las larvas infectadas con la cepa resistente a AmB y azoles que en las inoculadas con la cepa sensible. Además, la producción de melanina se correlacionó con la concentración del inóculo.

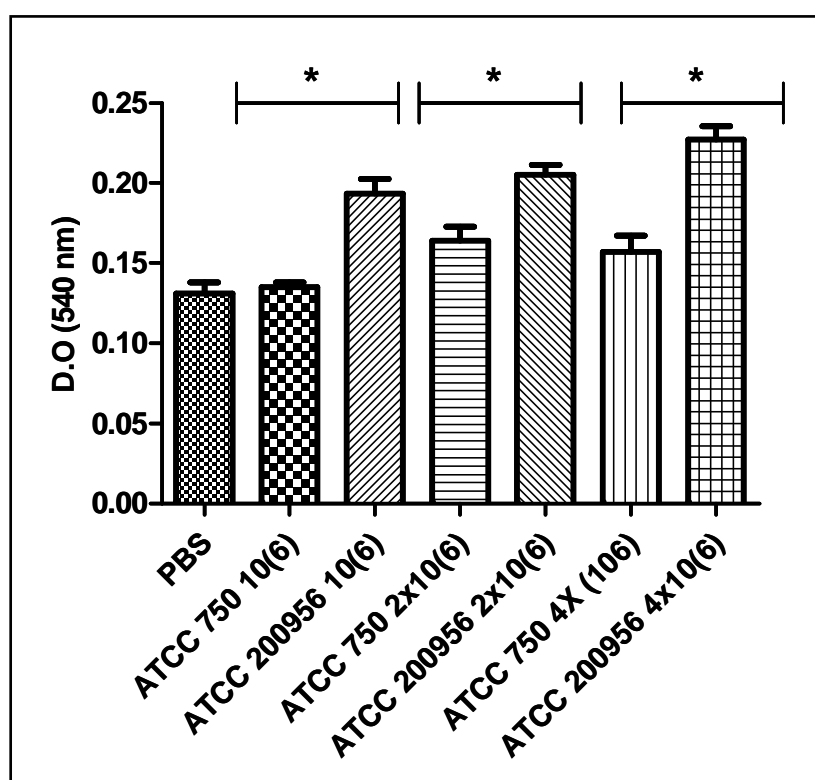


Figura 4.33. Cuantificación de la producción de melanina en larvas de *G. mellonella* infectadas con diferentes concentraciones de inóculo de *C. tropicalis* tras 1 h de incubación a 37°C. Los resultados corresponden a la MD \pm DE de los valores de las D.O. obtenidas de la hemolinfa de cada larva en cada grupo. Los asteriscos indican diferencia significativa ($p < 0,05$) entre las dos cepas inoculadas con las diferentes concentraciones de inóculo).

La fagocitosis juega un papel importante en la respuesta inmune innata de *G. mellonella* (Tojo y col., 2000), por lo que decidimos analizar si los hemocitos de este lepidóptero eran capaces de fagocitar las blastoconidias de *C. tropicalis*. Las levaduras de las cepas ATCC 750 y ATCC 200956 fueron internalizadas por los hemocitos de *G. mellonella* (Figura 4.34 A) como se ha observado con otras levaduras (García-Rodas y col., 2011; Gago y col., 2014). El porcentaje de fagocitosis fue similar en las dos cepas de

C. tropicalis (alrededor del 12-17 %), pero significativamente menor en comparación con *C. neoformans* ($p < 0,05$) (Figura 4.34 B).

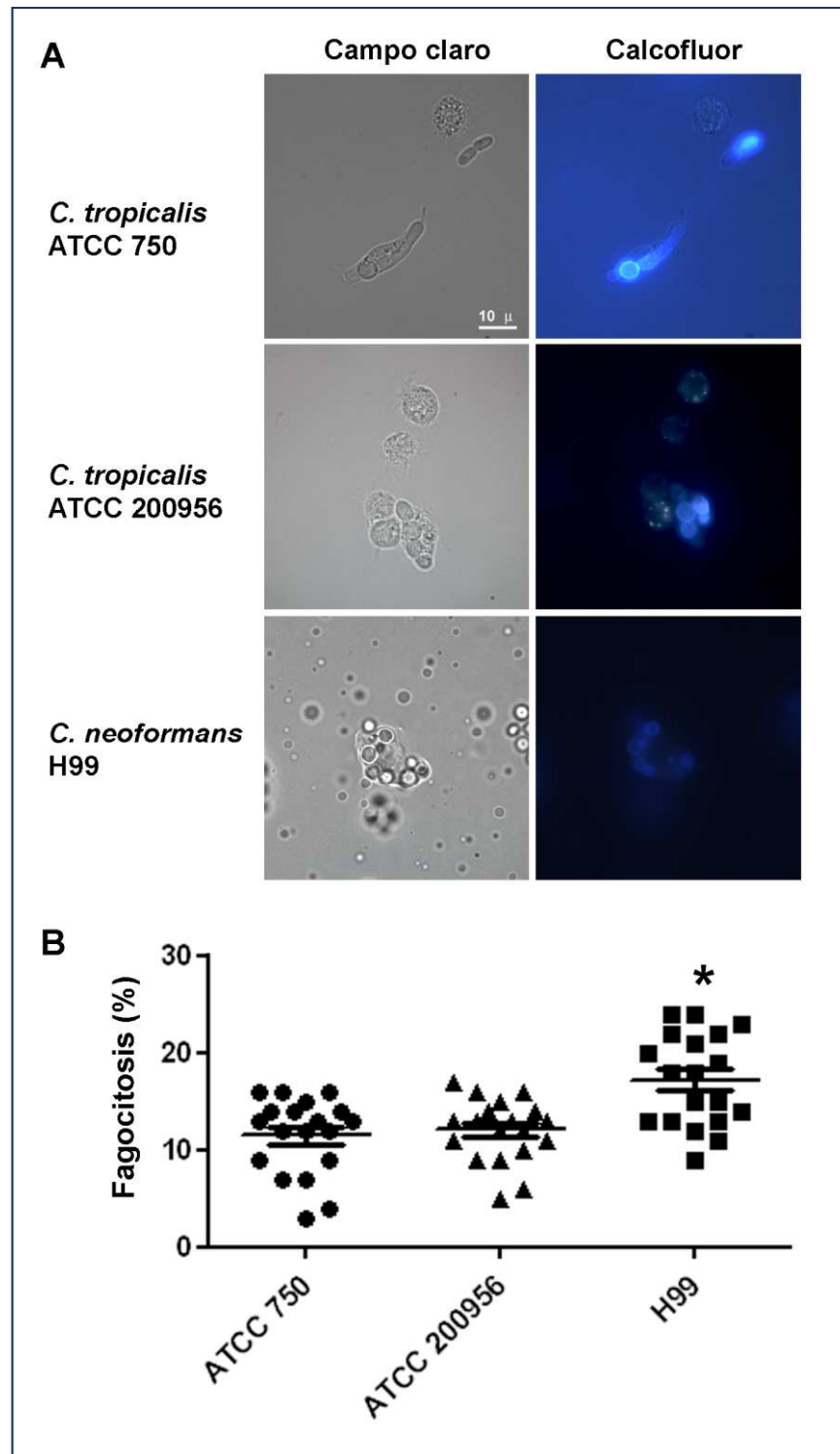


Figura 4.34. *Candida tropicalis* y *C. neoformans* fueron fagocitadas por los hemocitos de *G. mellonella*. Las larvas se inocularon con 10 μ L de una suspensión de levaduras preparadas a 10^9 células/mL de cada cepa, previamente tratadas con calcoflúor e incubadas a 37°C durante 2 h. A) Imágenes representativas de cada cepa. B) porcentaje de células que fagocitaron levaduras. Las levaduras de *C. neoformans* fueron más fagocitadas que las de *C. tropicalis* ($p < 0,05$).

La última levadura se incluyó como control del experimento, ya que en un trabajo previo en el laboratorio se había demostrado que células de esta especie es fácilmente fagocitada por los hemocitos de *G. mellonella* (García-Rodas y col., 2011)

4.6.1.1.2. Densidad hemocitaria en respuesta a la infección

Se ha observado que la concentración de hemocitos en la hemolinfa de *G. mellonella* puede cambiar en respuesta a la infección con microorganismos (Bergin y col., 2003). Por ello, investigamos si la inoculación *G. mellonella* con levaduras de *C. tropicalis* producía variación en la densidad hemocitaria. La inoculación de *C. tropicalis* (ATCC 750) resultó en una reducción de la concentración de hemocitos tras 2 y 7 h de infección ($p < 0,05$) en comparación a larvas inoculadas con PBS o sin inocular (control, Figura 4.35).

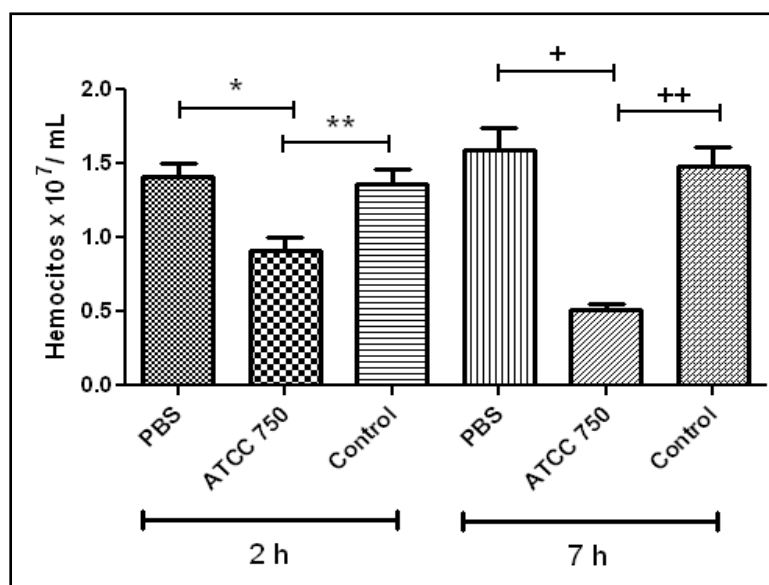


Figura 4.35. Densidad hemocitaria en *G. mellonella* tras la infección con *C. tropicalis* ATCC 750. La densidad hemocitaria en la hemolinfa se calculó como se describió en Materiales y Métodos después de 2 y 7 h de infección con una concentración de inóculo de 4×10^6 levaduras/larva. Un grupo de larvas no infectadas y otro inoculado con PBS fueron incluidos como controles (En la gráfica se representa el promedio y la desviación estándar de los resultados obtenidos de 10 larvas por grupo. Las diferencias estadísticas se señala con símbolos (* $p=0,0004$, ** $p=0,0028$, + $p < 0,0001$, ++ $p < 0,0001$).

4.6.1.1.3. Capacidad de filamentación de *C. tropicalis*

La formación de hifas verdaderas y/o pseudohifas se ha descrito como un proceso importante en la virulencia de *C. albicans* y de *C. tropicalis* (Cleary y col., 2010; Chai y col., 2010). Por ello, evaluamos si *C. tropicalis* inducía cambios morfológicos durante la infección en *G. mellonella*. Larvas infectadas con *C. tropicalis* fueron macerada a tiempo cero (T0) y tras 24 h de infección, observándose que aunque todas las cepas habían

formado pseudohifas dentro de *G. mellonella* tras 24 h de infección, éstas eran más cortas en la cepa ATCC 200956 (Figura 4.36).

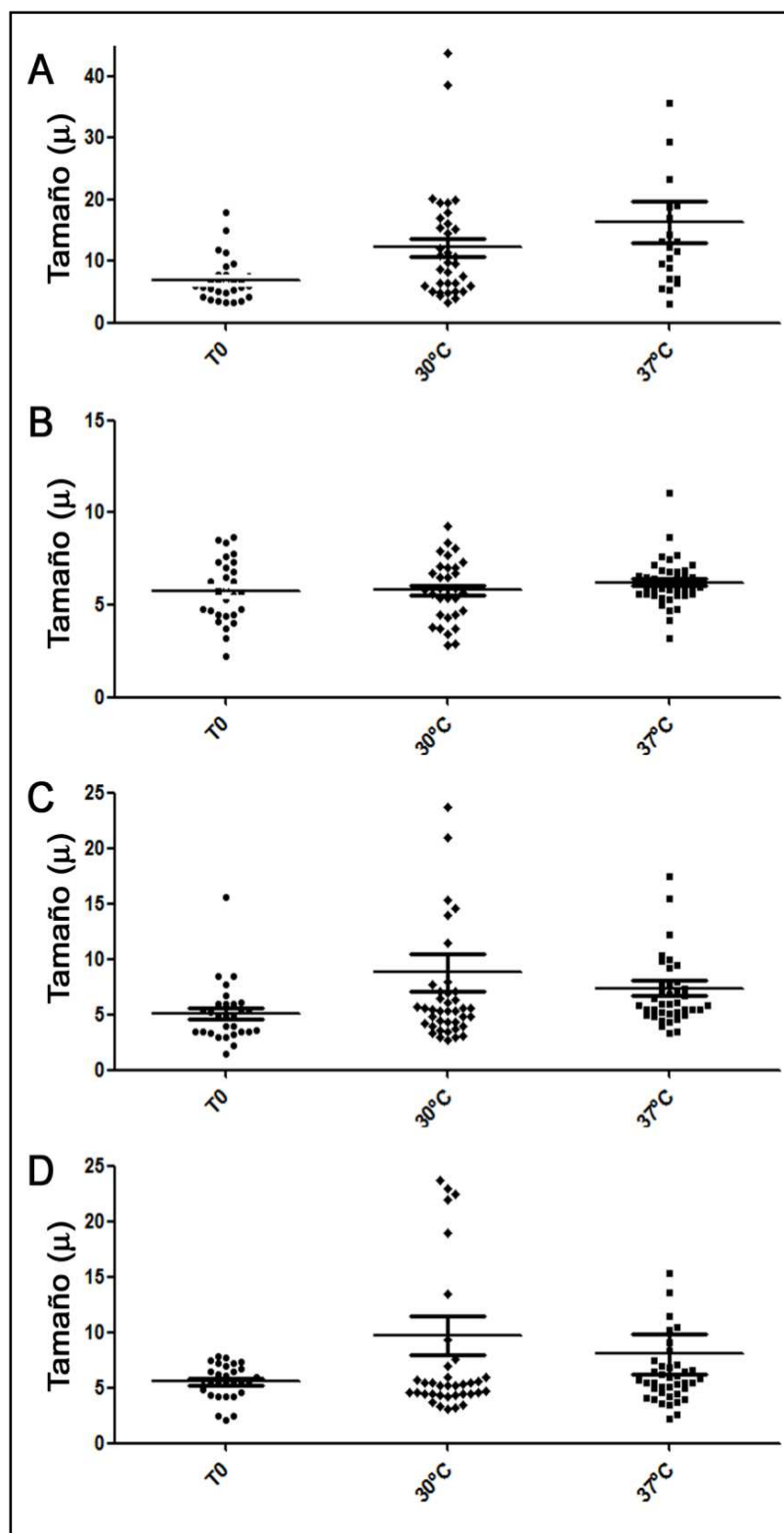


Figura 4.36. Filamentación de *C. tropicalis* durante la infección de *G. mellonella* A) ATCC 750. B) ATCC 200956. C) CL-7119 y D) CL-7868. La longitud de las células se determinó a tiempo cero (T0) y posterior a 24 h de inoculación a 30°C (♦) y 37°C (■).

4.6.1.2. Eficacia del tratamiento con antifúngicos durante la infección de *G. mellonella* con *C. tropicalis*

4.6.1.2.1. Supervivencia de *G. mellonella* infectadas con *C. tropicalis* y tratadas con diferentes antifúngicos

La utilidad de *G. mellonella* como un modelo *in vivo* para evaluar la eficacia de tratamientos en la infección con *C. tropicalis* se estudió con fármacos pertenecientes a todas las familias de antifúngicos utilizados en clínica. Además de la AmB, FCZ y VCZ, se incluyó la ANF como representante del grupo de las equinocandinas, ya que estos fármacos son los que actualmente se recomiendan como primera opción para el tratamiento de la candidiasis invasora.

En todos los casos, el 80% de las larvas infectadas no tratadas murieron al cabo de 3 - 4 días de infección. La supervivencia de las larvas tratadas dependió de la dosis de antifúngico y de la CMI de cada cepa *in vitro* (Figura 4.37). El tratamiento de las larvas con AmB, con dosis equivalente a la dosis terapéutica en humanos (3 mg/kg/día, equivalente a 1,2 µg/larva), aumentó significativamente la supervivencia de las larvas inoculadas con las cepas ATCC 750 y TP-13650 ($p=0,0015$ y $p=0,0002$, respectivamente). No obstante, las larvas inoculadas con las cepas ATCC 200956 y CL-6835 (Figura 4.37) no respondieron al tratamiento con AmB. En todos los casos se incluyeron larvas inoculadas con PBS o con el antifúngico como control de la supervivencia y de toxicidad. Ninguno de los antifúngicos utilizados para el tratamiento fue tóxico para las larvas a las dosis empleadas. Estos datos no se incluyen en las curvas de supervivencia para facilitar la visualización de los resultados. Los experimentos en los que hubo más del 10% de muerte de larvas en el grupo de PBS, se descartaron y no fueron incluidos en el análisis estadístico.

A continuación, el modelo se utilizó para comprobar la correlación *in vitro* - *in vivo* de estas cepas y los azoles. Las larvas inoculadas con la cepa ATCC 750, susceptible a los azoles, tratadas con VCZ (10 mg/kg/día, equivalente a 4 µg/larva) y FCZ 9 mg/kg/día (equivalente a 3,6 µg/larva), fue significativamente superior con respecto al grupo control sin tratamiento ($p_{VCZ}=0,0033$, $p_{FCZ}=0,0033$). Cuando las larvas fueron tratadas con una dosis inferior (2 mg/kg/día, equivalente a 0,8 µg/larva), los antifúngicos no protegieron de la infección y la mortalidad fue similar a la de los controles infectados y no tratados. Cuando la dosis de FCZ se incrementó (20 mg/kg/día, equivalente a 8 µg/larva), la supervivencia de las larvas tratadas fue significativamente superior ($p_{FCZ}=0,0033$). Por el contrario, el tratamiento con azoles no produjo cambios en la supervivencia de larvas

infectadas con la cepa TP-13650 con ninguna de las dosis testadas de FCZ ($p = 1, 0,4$ y $0,08$ respectivamente) o de VCZ ($p = 0,21$ y $0,06$, respectivamente). Resultados similares se observaron en la respuesta al tratamiento de las larvas infectadas con las cepas con resistencia cruzada (ATCC 200956 y CL-6835). Los valores de p se determinaron por comparación con los respectivos controles infectados y no tratados (Figura 4.38).

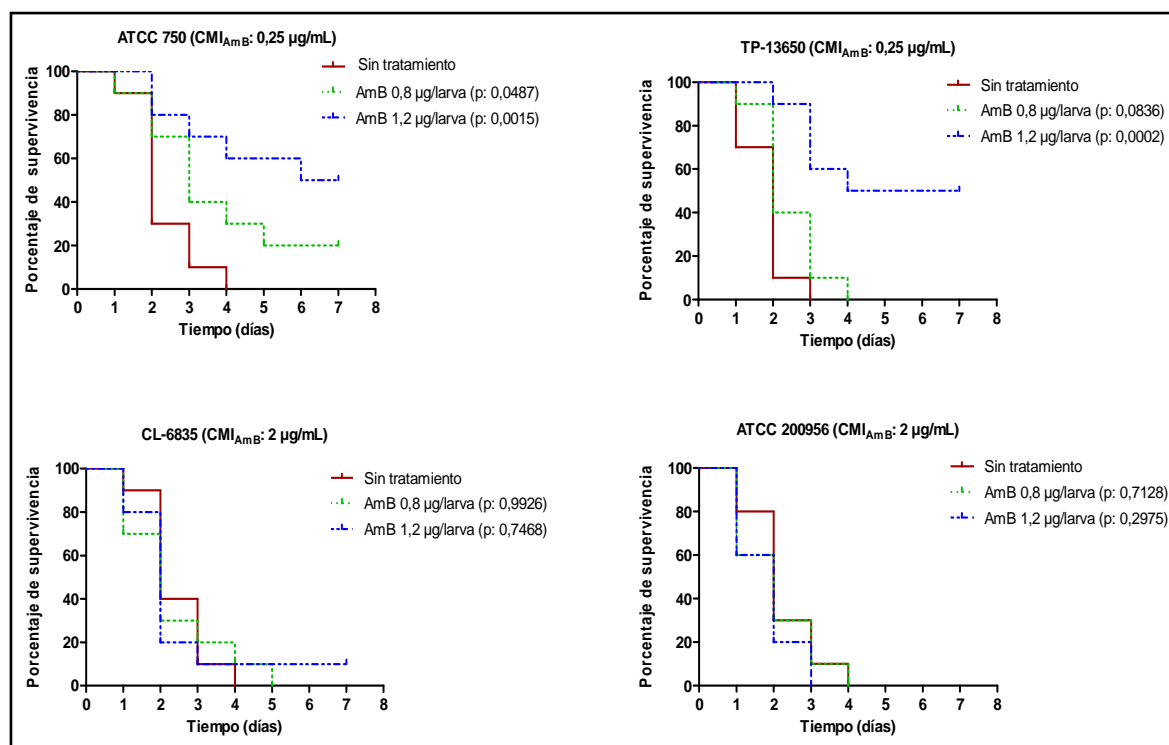


Figura 4.37. Eficacia de AmB en *G. mellonella* infectada con diferentes cepas de *C. tropicalis*. Las larvas fueron infectadas con 2×10^6 levaduras/larva excepto con la cepa ATCC 200956 que se utilizó una concentración de inóculo de 4×10^6 levaduras/larva. Tras la inoculación, las larvas fueron tratadas con 0,8 ó 1,2 µg/larva de AmB (correspondiente a la dosis subterapéutica y terapéutica, respectivamente). Un grupo infectado pero no tratado se incluyó como control.

El tratamiento de larvas de *G. mellonella* infectadas con ANF se incluyó como control de eficacia ya que todas las cepas de *C. tropicalis* eran sensibles a esta equinocandina (Figura 4.39). La supervivencia final fue estadísticamente significativa ($p < 0,01$) en comparación con las larvas control (infectadas no tratadas) para todas las cepas independientemente del perfil de susceptibilidad a AmB y azoles confirmando así la validez del modelo para la correlación *in vitro* - *in vivo*.

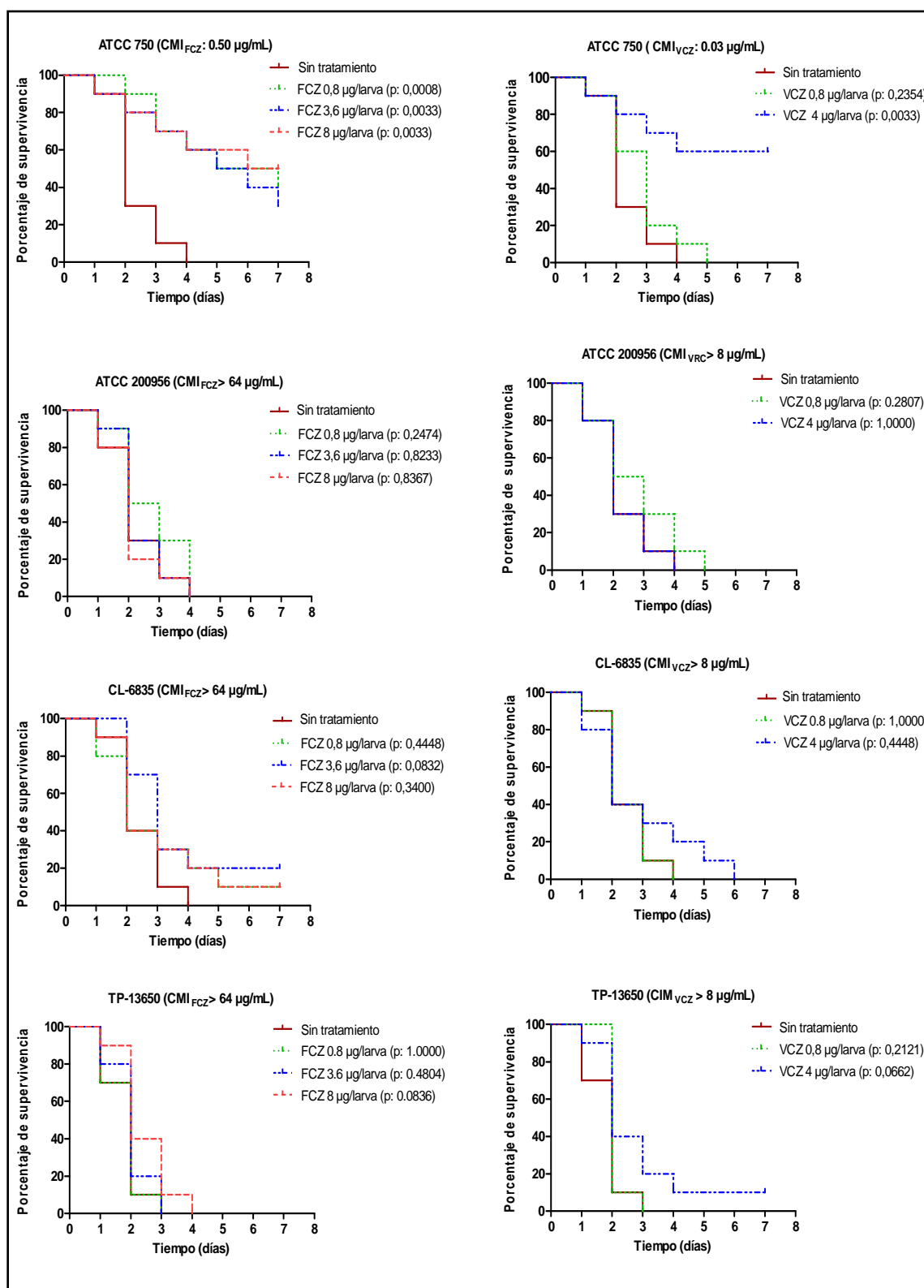


Figura 4.38. Eficacia de FCZ y VCZ en *G. mellonella* infectada con diferentes cepas de *C. tropicalis*. Tras la infección, las larvas fueron tratadas con a 0,8 ó 4 µg de VCZ/larva (dosis equivalente a la subterapéutica y terapéutica, respectivamente) o 0,8, 3,6 ó 8 µg de FCZ/larva (dosis equivalente a la subterapéutica, terapéutica o dos concentraciones por encima de la terapéutica, respectivamente).

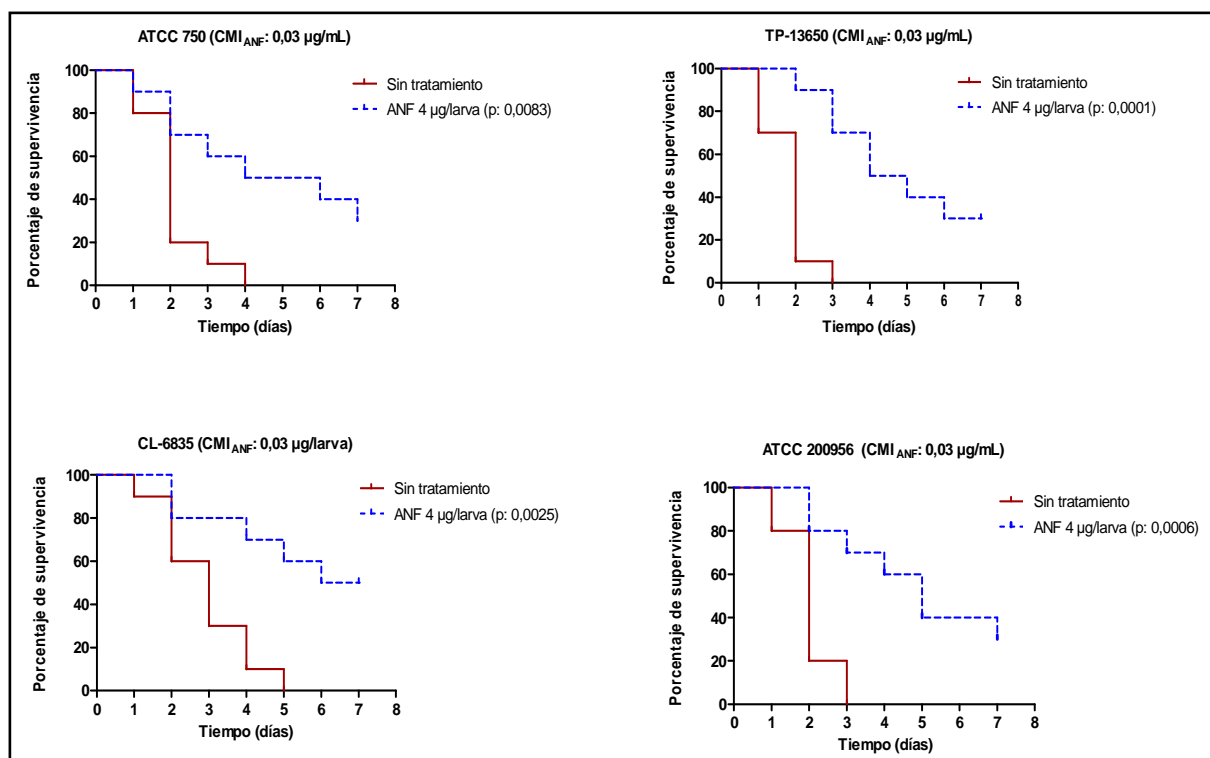


Figura 4.39. Eficacia del tratamiento con ANF en *G. mellonella* infectada con diferentes cepas de *C. tropicalis*. Las larvas fueron infectadas con 2×10^6 células/larva excepto con la cepa ATCC 200956. Tras la inoculación, las larvas fueron tratadas con 4 µg/larva de ANF (equivalente a 10 mg/kg). Un grupo infectado pero no tratado se incluyó como control.

4.6.1.2.2. Evaluación de la carga fúngica en *G. mellonella* tras el tratamiento con anfotericina B y fluconazol

La eficacia de AmB y de FCZ en el tratamiento de las larvas infectadas con la cepa ATCC 750 además se evaluó mediante la determinación la carga fúngica (unidades formadoras de colonia UFCs/larva). El número de UFCs aumentó significativamente durante la infección en comparación con el tiempo cero (Figura 4.40, $p < 0,05$ en todos los casos). Además, a partir del día uno, el tratamiento con FCZ o AmB redujo el número de levaduras en las larvas infectadas ($p < 0,05$).

4.6.1.2.3. Estudio histopatológico del tejido de *G. mellonella* infectada con *C. tropicalis*

Las larvas de *G. mellonella* infectadas con la cepa ATCC 750 (con y sin tratamiento antifúngico), se incluyeron en parafina para la realización de cortes histológicos con el fin de observar la estructura de las larvas y levaduras durante la infección. En la tinción con PAS de los cortes histológicos de las larvas sin tratamiento se observaron blastoconidias y pseudohifas. En las larvas tratadas, tanto con AmB como

con FCZ, aunque también se observaron estas estructuras, las áreas infectadas fueron menores así como la cantidad de estructuras fúngicas. Sin embargo, a diferencia de las larvas no tratadas, aquellas que recibieron tratamiento se observó que las estructuras fúngicas estaban rodeadas por células en una disposición similar a un granuloma que sugerían la limitación de la infección por la respuesta inmune (Figura 4.41).

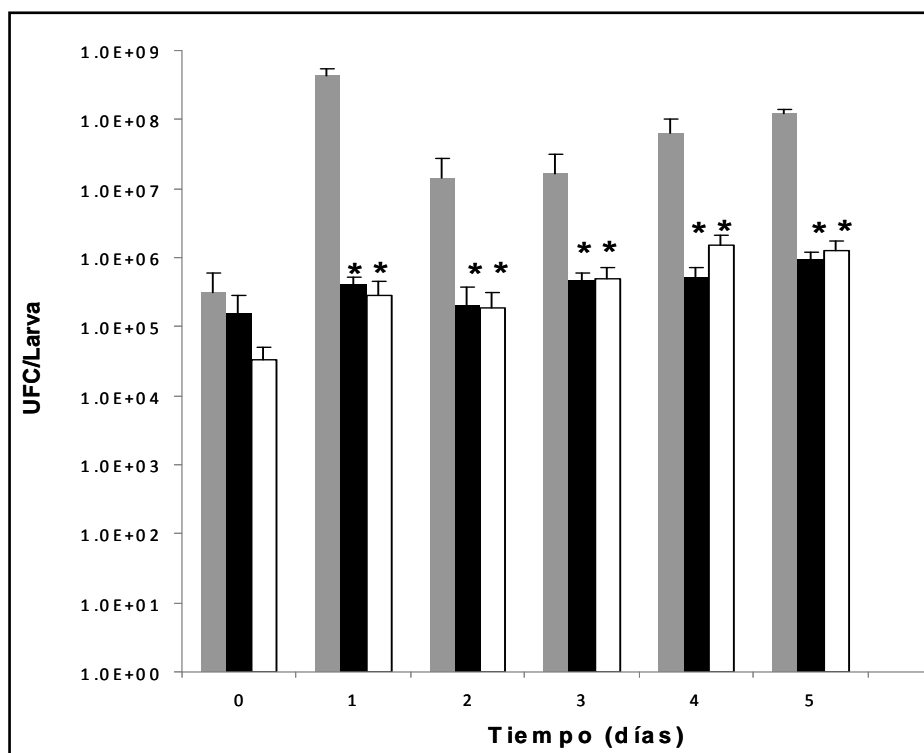


Figura 4.40. Carga fúngica durante la infección de *G. mellonella* infectadas con *C. tropicalis* ATCC750. Las larvas fueron tratadas con Amb (2 µg/gr de larva) (Barras blancas) o FCZ (5 µg/gr de larva) (Barras negras) o no tratadas (Barras grises). Los asteriscos indican diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

4.6.2. *Galleria mellonella* como huésped para evaluar virulencia de *Aspergillus* spp y eficacia antifúngica

4.6.2.1. Virulencia

Aspergillus fumigatus y *A. lentulus* son morfológicamente similares, pero difieren en la virulencia y sensibilidad a algunos antifúngicos. En este trabajo se utilizó *G. mellonella* con el objetivo de evaluar si en este modelo las diferencias encontradas *in vitro* se correlacionaban con la respuesta *in vivo*. Inicialmente, se estandarizó la concentración de inóculo adecuado para lograr la muerte del 50% de las larvas en los primeros dos o tres días tras la infección. Las larvas se inocularon con 10^5 ó 10^6 conidias/larva. En la Figura 4.42 se observa que la supervivencia de *G. mellonella*

infectadas con dos cepas salvajes *A. fumigatus* (CM-237) y *A. fumigatus* *akuB*^{KU80} es inferior a las larvas infectadas con *A. lentulus* (CM-1290), con ambos inóculos.

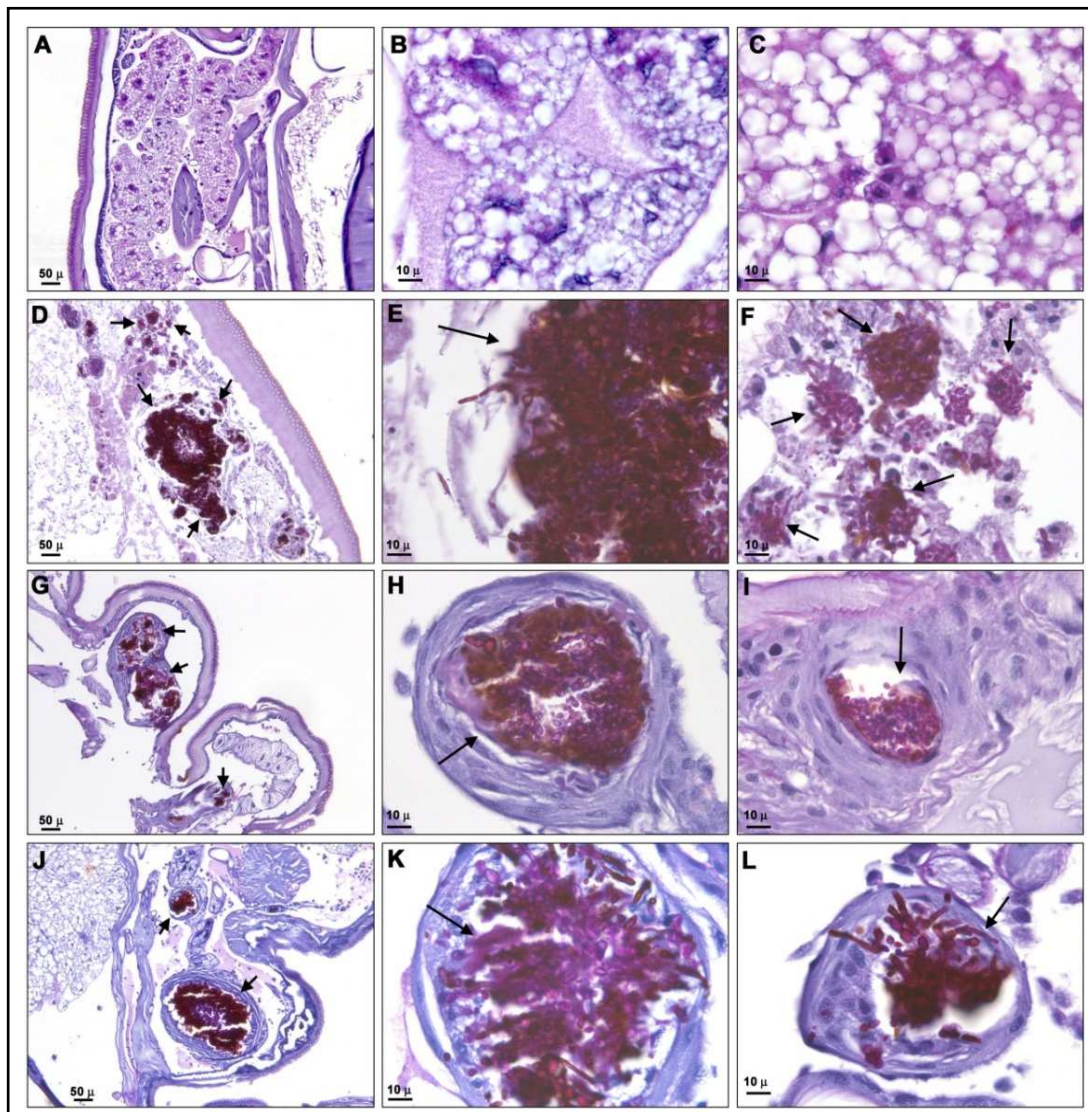


Figura 4.41. Cortes de tejido de *G. mellonella* infectadas con *C. tropicalis* y tratadas con AmB o FCZ. Las larvas se infectaron con 2×10^6 células de la cepa ATCC 750 y tratadas con AmB ($2 \mu\text{g/g}$ de larva) o FCZ ($5 \mu\text{g/g}$ larva). Larvas no infectadas se incluyeron como control. Tras cuatro días de infección, las larvas se procesaron para estudio histopatológico. Los paneles corresponden a cortes de tejido coloreado con PAS. Larvas no infectadas (A, B y C), larvas infectadas (D, E y F), larvas infectadas y tratadas con AmB (G, H, I) (20X) y larvas infectadas y tratadas con FCZ. (J, K, L). Las flechas indican áreas infectadas. Los aumentos de las fotos corresponden a 10, 40 y 63 X en cada fila de izquierda a derecha, respectivamente.

4.6.2.2. Eficacia del tratamiento con anfotericina B y voriconazol en la infección de *G. mellonella* con *Aspergillus* spp

Aspergillus fumigatus, a diferencia de *A. lentulus*, es sensible a AmB y VCZ *in vitro*. La eficacia de la AmB se observó en las larvas infectadas con los dos inóculos de *A. fumigatus* (10^5 y 10^6 conidias/larva) (Figura 4.43 A y B). Sin embargo, la AmB no fue

efectiva en las larvas infectadas con *A. lentulus* (Figura 4.43 C y D) con ninguno de los inóculos utilizados (10^5 y 10^6 conidias/larva).

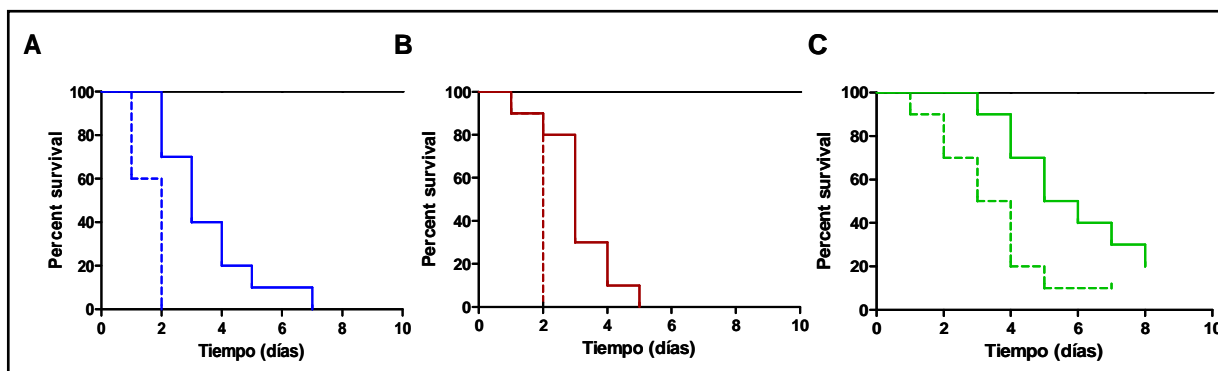


Figura 4.42. Supervivencia de *G. mellonella*. Con *A. fumigatus* CM-237 (A), *A. fumigatus* *akuB*^{KU80} (B) y *A. lentulus* (C). Las líneas continuas corresponden a larvas infectadas con 10^5 conidias/larva y las discontinuas con 10^6 conidias/larva. Los experimentos se llevaron a cabo a 37°C.

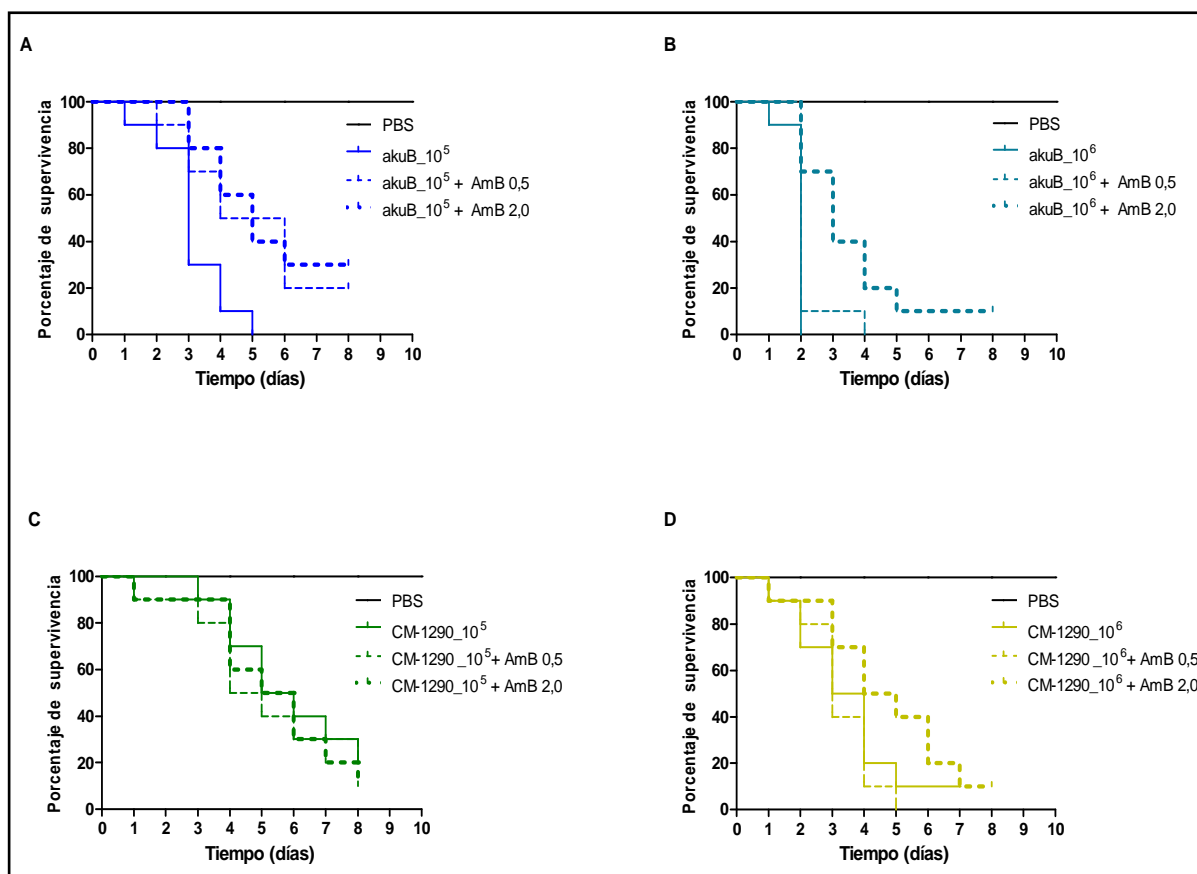


Figura 4.43. Larvas de *G. mellonella* infectadas con conidias de *A. fumigatus* CM-237: 10^5 y 10^6 (Figura A y B, respectivamente) y de *A. lentulus* CM-1290: 10^5 y 10^6 (Figura C y D, respectivamente) fueron tratadas con dos dosis de AmB (0,5 y 2 µg/larva) e incubadas a 37°C. En cada caso se incluyó un control de larvas infectadas sin tratamiento y de larvas inoculadas con PBS.

Una vez confirmada la correlación entre el fenotipo *in vitro* y la eficacia del tratamiento con AmB en *G. mellonella*, se procedió a evaluar el VCZ como un representante del grupo de los azoles. Los resultados fueron similares a los observados con la AmB. La supervivencia de las larvas infectadas con la cepa *akuB* de *A. fumigatus* y tratadas con VCZ fue superior a las larvas infectadas con este mismo hongo pero no tratadas o con *A. lentulus* en las dos condiciones (infectadas tratadas y no tratadas) de esta manera reproduciendo lo observado *in vitro* (Figura 4.44).

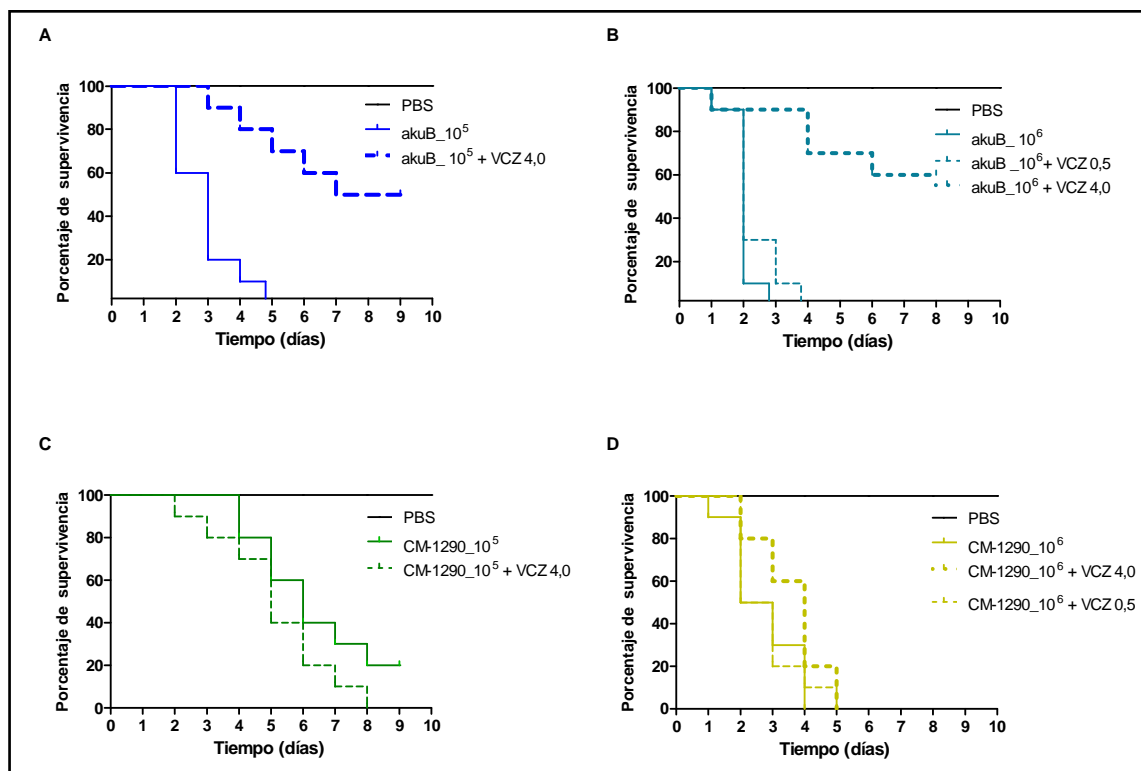


Figura 4.44. Larvas de *G. mellonella* infectadas con conidias de *A. fumigatus* CM-237: 10^5 y 10^6 (Figura A y B, respectivamente) y de *A. lentulus* CM-1290: 10^5 y 10^6 (Figura C y D, respectivamente) fueron tratadas con dos dosis de VCZ (0,5 y 4 μ g/larva equivalentes a 1,2 y 10 mg/kg/día, respectivamente) e incubadas a 37°C. En cada caso se incluyó un control de larvas infectadas sin tratamiento y de larvas inoculadas con agua inyectable.

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

En los últimos años, la incidencia de las infecciones fúngicas invasivas en pacientes inmunosuprimidos ha aumentado considerablemente. Aunque se han desarrollado nuevos métodos diagnósticos y nuevos antifúngicos, estas infecciones tienen asociadas elevadas tasas de morbilidad y mortalidad, lo que hace necesario profundizar en el conocimiento de estas enfermedades para diseñar estrategias terapéuticas más efectivas. Aunque se dispone de antifúngicos con diferentes dianas y mecanismos de acción, su administración está, en algunos casos, limitada por la toxicidad, la farmacodinámica desconocida, el desarrollo de resistencia o la falta de actividad contra microorganismos emergentes. Por ello, el desarrollo de nuevos fármacos es un área prioritaria en el campo de la micología clínica. Sin embargo, en el contexto actual, es complicado que aparezcan nuevas familias de antifúngicos debido al tiempo que requiere el desarrollo de un nuevo fármaco y el coste asociado. Por ello, el estudio y la caracterización del mecanismo de acción de los fármacos que hay disponibles para mejorar su eficacia o disminuir la toxicidad es de gran importancia. Esto permitiría además llevar a cabo modificaciones en fármacos existentes con el fin de mejorar su eficacia, y en lo posible, su espectro. Por estas razones, en este trabajo hemos abordado el estudio del mecanismo de acción de la AmB así como de resistencia a AmB, cruzada entre AmB y azoles o a los azoles en levaduras y/o en hongos filamentosos.

La anfotericina B, a pesar de su uso desde hace más de 50 años y de la toxicidad asociada, es aún el fármaco de elección para el tratamiento de algunas infecciones sistémicas dado su amplio espectro de actividad, el bajo nivel de resistencia y su potente acción fungicida. Clásicamente el mecanismo de acción descrito para este antifúngico ha sido la formación de canales en la bicapa lipídica tras unirse al ergosterol, aunque diferentes estudios indican que la AmB tiene otros efectos sobre la célula, como es la inducción de estrés oxidativo (Sokol-Anderson y col., 1986; Phillips y col., 2003; Belenky y col., 2013). El desconocimiento del mecanismo acción exacto de este antifúngico ha limitado la caracterización detallada de los mecanismos de resistencia. Por todo ello, una parte de este trabajo se ha centrado en el estudio del estrés oxidativo en el mecanismo de acción de la AmB y/o la resistencia frente a este antifúngico.

La caracterización molecular de cepas resistentes es la mejor estrategia para el descubrimiento del mecanismo de resistencia de hongos frente a antifúngicos. De esta forma, se han descubierto mutaciones en genes clave que explican la resistencia a distintas familias de antifúngicos como azoles y equinocandinas. La resistencia adquirida a la AmB es poco frecuente, posiblemente por algunas de las siguientes razones: (i) es

un fármaco fungicida por lo que el efecto es rápido dejando poca posibilidad al desarrollo de mecanismos de resistencia, (ii) su elevada toxicidad, que impide la utilización en tratamientos prolongados, (iii) la asociación de la resistencia con la deficiencia en ergosterol, lo que supone una desventaja evolutiva para el hongo y por tanto una menor posibilidad de seleccionarse *in vivo* o (iv) por el efecto pleiotrópico que tiene sobre las células fúngicas, lo que implica que la resistencia se adquiere por acumulación de múltiples alteraciones en una misma célula, algo que ocurre con baja probabilidad. Sin embargo, existen estudios en los que se han aislado cepas resistentes a AmB tras mutagénesis celular. De esta manera, se ha encontrado que la interrupción de genes en la vía de síntesis de ergosterol (Seo y col., 1999; Vincent y col., 2013) o cambios de la pared fúngica (Seo y col., 1999; Hapala y col., 2005) pueden causar resistencia a AmB.

En este trabajo hemos estudiado el papel que juega la producción de radicales libres en el mecanismo de acción de la AmB, utilizando dos abordajes paralelos: en primer lugar, se caracterizó la producción de ROS en distintas levaduras patógenas, sensibles a este antifúngico así como algunos factores que influyen en la inducción de estrés oxidativo. En segundo lugar, se estudio el efecto de la AmB en cepas clínicas con resistencia adquirida, intrínseca o primaria sobre la producción de ROS.

5.1. Importancia del estrés oxidativo en el mecanismo de acción de la anfotericina B

El mecanismo de acción de la AmB no está totalmente caracterizado a pesar del amplio uso de la misma en el entorno clínico, tanto para el tratamiento de infecciones causadas por diferentes hongos como para infecciones parasitarias como la leishmaniasis visceral. El primer mecanismo de acción descrito para AmB es la formación de poros por la unión de varias moléculas al ergosterol (Finkelstein y Holz, 1973). Sin embargo, recientemente se ha postulado que la simple unión de la AmB al ergosterol (secuestro) es suficiente para alterar la estructura y función de la membrana celular fúngica (Gray y col., 2012). Por otro lado, se ha demostrado que fármacos fungicidas, incluyendo la AmB, inducen la producción de ROS en *C. albicans*, *S. cerevisiae* y *C. gattii* (Belenky y col., 2013; Ferreira y col., 2013). Este mecanismo de acción también se ha encontrado en otras moléculas fungicidas como la histatina 5 (Helmerhorst y col., 2001), el miconazol (Kobayashi y col., 2002). Esta información sugiere una relación entre la acción fungicida y la inducción de estrés oxidativo. Nuestros resultados demuestran que la acumulación de ROS, en presencia de AmB, es un efecto común a levaduras de diferentes géneros y/o especies. Sin embargo, encontramos diferencia en el porcentaje de células que acumularon ROS entre las distintas especies, siendo *C. tropicalis* y

C. krusei en las que se detectó menor acumulación de ROS. Cabe destacar que *C. krusei* es una de las especies del género *Candida* menos sensible a varios antifúngicos. Sin embargo, no tenemos una explicación para lo observado en *C. tropicalis* ya que su sensibilidad *in vitro* a todos los antifúngicos es comparable con las demás especies. Es posible que *C. tropicalis* presente diferencias en la composición y estructura de la membrana, de la pared o en su capacidad de respuesta a estrés.

Las ROS se forman principalmente en la mitocondria como subproductos de la cadena transportadora de electrones. La producción basal de radicales libres parece jugar un papel importante en la regulación del metabolismo y en el envejecimiento (Ram y Klis, 2006; Sena y Chandel, 2012). Sin embargo, cuando su concentración celular aumenta, pueden causar la muerte celular ya que inducen múltiples daños en las células. Estas moléculas son capaces de alterar la estructura de lípidos (peroxidación lipídica), de proteínas ya que al reaccionar con algunos aminoácidos forman grupos carbonilo (carbonilación proteica), y de ácidos nucleicos produciendo rotura del ADN (Farr y Kogoma, 1991). En *C. albicans*, se ha descrito que la AmB induce apoptosis mediada por acumulación de radicales libres (Phillips y col., 2003; Dai y col., 2009).

La detección de los grupos carbonilo es un indicador estrés oxidativo en las proteínas (Irazusta y col., 2008). Nosotros hemos confirmado que la acumulación de ROS, en respuesta a la AmB y al H_2O_2 , induce carbonilación y que este daño es menor en cepas resistentes a AmB que cepas sensibles. Además, se evaluó el efecto del H_2O_2 y se observó que la carbonilación producida por ésta molécula era más fuerte que la inducida por AmB. La diferencia en la capacidad de carbonilar proteínas entre la AmB y el H_2O_2 podría deberse a que el efecto oxidante del H_2O_2 es mayor que el de la AmB y/o a que el mecanismo de acción de la AmB no sólo dependa de la capacidad de producir estrés oxidativo sino que tiene otros efectos en la célula.

En este trabajo, hemos observado que cuando la AmB está en presencia de la L-cisteína no se detectan ROS y además las células son protegidas de la acción fungicida de la AmB. Este aminoácido tiene propiedades antioxidantes y participa en reacciones redox gracias a la presencia del grupo tiol (Lan y col., 2013). Por otro lado, el pretratamiento de *C. albicans* y *S. cerevisiae* con tiourea, un captador de radicales hidroxilo, disminuye la producción de ROS y la muerte celular provocada por AmB o por miconazol (Belenky y col., 2013).

La disponibilidad de cepas resistentes a antifúngicos es una herramienta muy útil para investigar el mecanismo de acción de los mismos. En este trabajo se utilizaron

distintos modelos de resistencia: adquirida o secundaria en levaduras (*Candida* spp.) e intrínseca o primaria en hongos filamentosos (*A. lentulus* y *A. terreus*). Las cepas de *C. tropicalis* resistentes a AmB no tenían ergosterol en su membrana debido a mutaciones en los genes *ERG11* y *ERG3*. Como consecuencia de ello, estas cepas también fueron resistentes a los azoles. Además, en estas cepas se detectaron alteraciones relacionadas con el metabolismo oxidativo. Ya que la producción de ROS ocurre principalmente en la mitocondria, pensamos que AmB puede inducir su acción fungicida a través de ésta organela. En estas cepas resistentes, la AmB no causó una acumulación significativa de ROS. Además, estos aislamientos presentaron diferencias en el potencial de membrana mitocondrial y en el crecimiento en presencia de sustratos respiratorios en comparación con las cepas sensibles. Los resultados apoyan la idea de que la mitocondria juega un papel relevante en el mecanismo de acción de la AmB, y que mecanismos que afecten la funcionalidad de la mitocondria y la producción de ROS favorecen la adaptación a AmB.

La inhibición del complejo I de la cadena respiratoria con rotenona redujo la producción de ROS y protegió a las células de la actividad fungicida de este fármaco, confirmando que la mitocondria participa en la actividad de la AmB. Este resultado está de acuerdo con resultados de otros trabajos en los que se demuestra que mutantes de *C. albicans* afectados en la NADH deshidrogenasa tienen mayor resistencia a AmB (Belenky y col., 2013). La inhibición del complejo I en *Drosophila melanogaster* prolonga la vida de las moscas, lo cual se ha relacionado con una disminución en la producción mitocondrial de ROS o con alteraciones en el balance NAD^+/NADH en la célula (Stefanatos y Sanz, 2011). Otros trabajos demuestran que algunos antifúngicos fungicidas actúan a través de inducción de ROS en la mitocondria en *S. cerevisiae*. Esta inducción parece estar mediada por rutas de señalización como la proteína quinasa A (PKA). Además, mutantes afectados en enzimas mitocondriales, como la citrato sintasa o la succinato deshidrogenasa, tienen también sensibilidad reducida a la AmB (Belenky y col., 2013). El papel de la mitocondria en la resistencia a la AmB ha sido demostrada en mutantes de *Kluyveromyces lactis* con alteración en la función de la citocromo c oxidasa (Sarinova y col., 2007).

En este trabajo también utilizamos un modelo de resistencia primaria o intrínseca a AmB, tomando como organismos de referencia a los hongos filamentosos *A. terreus* y *A. lentulus*. En estos hongos, observamos que la AmB no indujo acumulación significativa de ROS, en contra de lo que se observa en especies de *Aspergillus* sensibles a este antifúngico, como *A. fumigatus*. Estos resultados están de acuerdo con lo observado en

las cepas resistentes de *C. tropicalis*. Por lo tanto, nuestros resultados muestran una relación estrecha entre la resistencia a AmB y el metabolismo oxidativo de la célula.

Clásicamente se ha descrito que la resistencia a AmB se produce por la ausencia de ergosterol. No obstante, existen evidencias de que éste no es el único mecanismo de resistencia a la AmB. De hecho, revisando la literatura se encuentra que la resistencia a AmB puede originarse por mecanismos dependientes o independientes de ergosterol. Por ejemplo, en *C. albicans* se han logrado mutantes resistentes a AmB carentes de ergosterol en la membrana (Sanglard y col., 2003), mientras que en *C. neoformans* se han encontrado cepas resistentes con niveles normales de ergosterol (Joseph-Horne y col., 1996). Asimismo, en resultados obtenidos en nuestro laboratorio así como otros ya publicados no han encontrado relación entre la baja sensibilidad *A. terreus* a AmB y el contenido de ergosterol en la membrana celular o alteraciones en los metabolitos de su vía de síntesis (Joseph-Horne y col., 1996; Blum y col., 2008) ya que no hubo variación significativa con respecto a cepas sensibles de *A. fumigatus*. Sin embargo, en esta especie se han encontrado niveles basales de actividad catalasa elevados en comparación con *A. fumigatus*, sugiriendo que esta especie tiene mayor capacidad para detoxificar ROS (Blum y col., 2008). En nuestro caso, así como se observó con *A. terreus*, la baja sensibilidad de *A. lentulus* a la AmB, no fue atribuible a cambios en el contenido de ergosterol. Por lo tanto, nuestro trabajo apoya la idea de que la resistencia intrínseca en estos hongos filamentosos poder estar más relacionada con la capacidad de respuesta a estrés oxidativo. Por el momento se desconoce si *A. lentulus* tiene mayores niveles de catalasa como ocurre en *A. terreus*, lo que supone un aspecto importante a estudiar en el futuro.

La detoxificación de ROS en la célula ocurre mediante sistemas antioxidantes como el glutatión o por enzimas como la catalasa o la SOD (Nystrom, 2005; Chauhan y col., 2006; Herrero y col., 2008). Nuestros resultados demuestran que las cepas de *C. tropicalis* resistentes a AmB tienen mayor actividad catalasa que las cepas sensibles. En este sentido se sabe que la adición exógena de catalasa protege a *C. albicans* de la acción fungicida de la AmB (Sokol-Anderson y col., 1986). Además, se ha demostrado que el metrotexato (un compuesto antineoplásico) induce la actividad de la catalasa y favorece el desarrollo de resistencia a AmB en *C. albicans* (Sokol-Anderson y col., 1986; Linares y col., 2006). Por otra parte, la inhibición de otras enzimas detoxificantes de ROS, como la SOD con N,N'-dietilditiocarbamato (DDC) o la tetratiomolibdato (ATM) potencian la actividad de AmB contra biopelículas formadas por *C. albicans*, favoreciendo así el daño oxidativo (de Brucker y col., 2013). Trabajos previos han demostrado que el

incremento de la actividad catalasa puede resultar de la activación de la ruta Hog1 en respuesta a estrés (Quinn y Brown, 2007). Los resultados indican que la capacidad que tiene la célula de detoxificar radicales libres influye en la sensibilidad a la AmB. La resistencia del parásito *Leishmania donovani* a AmB también se produce por varios mecanismos simultáneos, incluyendo disminución en la producción de ROS, la activación de mecanismos antioxidantes y la ausencia de ergosterol en la membrana celular (Purkait y col., 2012).

Por otro lado, algunos mutantes de *A. flavus* resistentes a AmB tienen mayor cantidad de α -1,3-glucanos en la pared sin cambios en el contenido de ergosterol (Seo y col., 1999). También, en mutantes de la levadura *Kluyveromyces lactis* con baja sensibilidad a la AmB, se han observado cambios en la composición/estructura de la pared celular (Sarinova y col., 2007). Es posible que los cambios en la pared observados en las cepas de *C. tropicalis* resistentes a AmB sean el resultado de un mecanismo activado para compensar los defectos en la composición de los esteroides de la membrana, como consecuencia de la ausencia de ergosterol. Además, es razonable pensar que la ausencia de ergosterol y por lo tanto cambios en la fluidez de la membrana afecten al anclaje y estabilidad de la pared lo que podría inducir mecanismos compensatorios (acumulación de β -glucanos y quitina) sin que necesariamente tengan un papel en la resistencia a la AmB.

El rojo Congo es un compuesto que se une a la quitina, y por lo tanto, altera la función de enzimas importantes en la unión de la quitina a los β -1,3 y β -1,6-glucanos, lo que produce una desestabilización de la pared celular (Ram y Klis, 2006). Se ha demostrado que mutantes con disminución en la cantidad de quitina son más resistentes al efecto del rojo Congo (Imai y col., 2005). Aunque en las cepas de *C. tropicalis* resistentes a AmB, que además lo fueron al efecto del rojo Congo, no se cuantificó el contenido de quitina, se observó un cambio en el contenido de β -1,3- glucanos sugiriendo una posible alteración en la proporción de estos polisacáridos en la pared celular.

El papel de la pared celular en la resistencia antifúngica es un aspecto poco estudiado, pero se ha sugerido que esta estructura impide la acción de la AmB por la unión de la molécula a componentes de la pared evitando así la penetración hasta la membrana celular (Seo y col., 1999). Por ello, sería de interés estudiar si existen diferencias en la estructura/composición de la pared celular entre *A. lentulus* y *A. fumigatus* para tratar de explicar la diferencia en la susceptibilidad a la AmB entre estas dos especies.

La adaptación al estrés oxidativo y cambios en la pared celular dependen de la activación de rutas de señalización en las que participan MAP quinasas. Las principales quinasas involucradas son Hog1 (importante en la regulación de la respuesta a estrés oxidativo y a alta osmolaridad) y Mkc1 y Cek (que responden a cambios en la pared) (Sanglard y Bille, 2002; Quinn y Brown, 2007; Roman y col., 2007; Leach y col., 2012). Un trabajo complementario, realizado por Román y col., con la cepa de *C. tropicalis* ATCC 200956 resistente a AmB estudiada a lo largo de este trabajo, encontraron alteración en rutas de las MAP quinasas (comunicación personal), indicando una posible participación de estas en el mecanismo de acción de la AmB.

Por otro lado, la resistencia al efecto del rojo Congo, observada en las cepas de *C. tropicales* resistentes a la AmB, puede ser el producto de la activación de mecanismos de respuesta a estrés. Los componentes de la pared celular están bajo control dinámico y regulado por estrés. Algunos mutantes de levaduras con alteración en la composición de la pared celular, presentan diferente respuesta al estrés externo en comparación con las cepas silvestres (Imai y col., 2005).

La capacidad de respuesta a estrés mediada por el complejo calcineurina-Hsp90 es un factor importante en la susceptibilidad/resistencia antifúngica como se ha demostrado (Cowen y Lindquist, 2005). La baja sensibilidad de *A. terreus* a AmB ha sido relacionada con incremento basal de la Hsp90 en comparación con cepas sensibles (Blum y col., 2013). Además, se conoce que el bloqueo de la Hsp90 con un anticuerpo específico contra esta chaperona, potencia la respuesta a AmB en pacientes con candidiasis invasiva (Pachl y col., 2006). Por otro lado, el bloqueo de la Hsp90 tiene efecto sinérgico, tanto *in vitro* como *in vivo*, con fluconazol en *C. albicans*, convirtiendo la actividad fungistática de este azol en una acción fungicida. Resultados similares se han obtenido para *A. fumigatus* con caspofungina en cepas resistentes a este antifúngico. (Cowen y col., 2009).

Con los resultados obtenidos en esta primera parte del trabajo podemos concluir que la AmB tiene diferentes efectos en la célula fúngica. Ésto está de acuerdo con estudios proteómicos que indican que la AmB induce cambios en la respuesta a estrés oxidativo, tolerancia osmótica, síntesis de ergosterol, metabolismo de carbohidratos y biosíntesis de aminoácidos (Liu y col., 2005; Hoehamer y col., 2010). Además, en células de mamífero, la AmB tiene afinidad, no sólo por el colesterol, sino también por los receptores TLR ("toll-like receptors"), estimulando un efecto inmunomodulador. Todas estas evidencias apoyan la conclusión que el mecanismo de acción de la AmB no implica sólo la formación de canales en la membrana celular, sino otros aspectos como la

inducción de daño oxidativo. Ésto explica el fuerte efecto fungicida de este fármaco y la baja resistencia clínica, ya que es necesaria la acumulación de varios mecanismos para conseguir la adaptación a AmB. La demostración de que el estrés oxidativo juega un papel en el mecanismo de acción de la AmB abre la puerta a diseñar estrategias que pretendan potenciar este efecto. Así pues, es posible que inhibidores de enzimas antioxidantes o de compuestos pro-oxidantes (como el ácido ascórbico) puedan potenciar el efecto de la AmB. Existen evidencias de que el ácido ascórbico (vitamina C) potencia la acción de la AmB contra *C. albicans* y *C. neoformans* (Brajtburg y col., 1989) y tiene la ventaja de no ser tóxico para las células humanas. Creemos que estos resultados son relevantes y constituyen una importante contribución a la comprensión del mecanismo de acción de la AmB de donde se pueden derivar nuevas líneas de investigación que podrían mejorar la eficacia de tratamientos basados en AmB.

5.2. Mecanismo de resistencia a azoles y resistencia cruzada con anfotericina B

En este trabajo además de abordar el mecanismo de acción de AmB, también se estudió el mecanismo de resistencia a azoles para lo que se incluyeron dos cepas de *C. tropicalis* con resistencia cruzada a azoles y AmB (ATCC 200956 y CL-6835) y otra solo resistente a los azoles (TP-13650). Esta última cepa (solo resistente a azoles), tenía una cantidad de ergosterol similar a la cepa de *C. tropicalis* de referencia (ATCC 750, sensible a todos los antifúngicos). Sin embargo, en las dos cepas con resistencia cruzada, no se detectó ergosterol en la membrana celular. Las cepas que carecen de ergosterol comparten tres características: i) mutación en los genes *ERG11* y *ERG3*, ii) presencia de otros esteroides en la membrana celular compensando la ausencia de ergosterol, iii) resistencia cruzada a AmB y azoles. Fenotipos similares de resistencia cruzada se han encontrado en *C. albicans* (Geber y col., 1995; Kelly y col., 1997; Nolte y col., 1997) incluyendo mutaciones simultáneas en el *ERG11* y el *ERG3* o *ERG5* (gen que codifica la enzima C-22 desaturasa) (Martel y col., 2010). Sin embargo, la cepa solo resistente a azoles presenta una mutación con cambio de un aminoácido en el *ERG11* (F132Y) sin depleción en el contenido de ergosterol. Estos resultados sugieren un papel importante del *ERG11* en la resistencia a los azoles y de la combinación de mutaciones (*ERG11* y *ERG3*) en la resistencia cruzada azoles-AmB.

El mismo mecanismo combinado de resistencia cruzada a AmB y azoles, (la mutación en el *ERG3* (S258F) y la delección de 43 aminoácidos en el *ERG11*) encontrado en la cepa ATCC 200956 ha sido recientemente descrito en esta misma cepa (Vincent y col., 2013) y en un aislamiento clínico en Túnez (Eddouzi y col., 2013). Es posible que la localización de la delección y los cambios de aminoácidos encontrados en *ERG3*,

correspondan a puntos calientes (*hot spots*) de estos genes como ha sido sugerido por (Jiang y col., 2013) para el gen *ERG11*.

El análisis de la secuencia y estructura de la proteína enzima 14- α esterol demetilasa (Erg11p) permitieron confirmar que la delección en el *ERG11* encontrada en la cepa ATCC 200956 se correspondía con la escisión de la hélice “I” en Erg11p, un sitio clave en la interacción con los azoles (Xiao y col., 2004). En *S. cerevisiae* y *C. glabrata* se ha descrito que mutaciones puntuales en este dominio son suficientes para inhibir la actividad de Erg11p (Ishida y col., 1988; Hull y col., 2012). Sin embargo, el fenotipo de sensibilidad en las cepas ATCC 200956 y CL-6835 fue similar a pesar de la delección en la primera, lo que sugiere que el cambio de aminoácido en la cepa CL-6835 (G464D) estaba ubicado en un sitio clave de la enzima, que no sólo supone una menor afinidad por el antifúngico sino que también altera su función.

Otros estudios han demostrado que las sustituciones de la glicina 464 (G464D/S) (presente en la cepa CL-6835) y las de triptófano (Y132F/H) (presente en la cepa TP-13650), ambas localizadas cerca del grupo hemo en Erg11p, son claramente responsables de una menor susceptibilidad a los azoles en levaduras y hongos filamentosos de importancia médica (Kelly y col., 1999; Rodero y col., 2003; Chau y col., 2004; Pelaez y col., 2012; Sionov y col., 2012). De forma similar, en hongos patógenos de plantas se han encontrado mutaciones en estos dos aminoácidos clave relacionados con una menor susceptibilidad a inhibidores de la 14- α esterol demetilasa (DMIs) (Canas-Gutierrez y col., 2009; Mullins y col., 2011).

En nuestro laboratorio, utilizando un programa bioinformática, se modeló una estructura tridimensional de la Erg11p de las cepas de *C. tropicalis* que tenían las mutaciones G464D y Y132F identificadas en este trabajo así como otras secuencias con sustituciones similares, G464S y Y132H, previamente publicadas en *C. albicans* (Kelly y col., 1999; Park y col., 2011)(**Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Con esta estructura se observó que la sustitución G464D, presente en la cepas CL-6835 (por primera vez descrita en *C. tropicalis*), está localizada en el domino de unión al grupo hemo (Forastiero y col., 2013) y sitio importante en la actividad catalítica de la enzima.

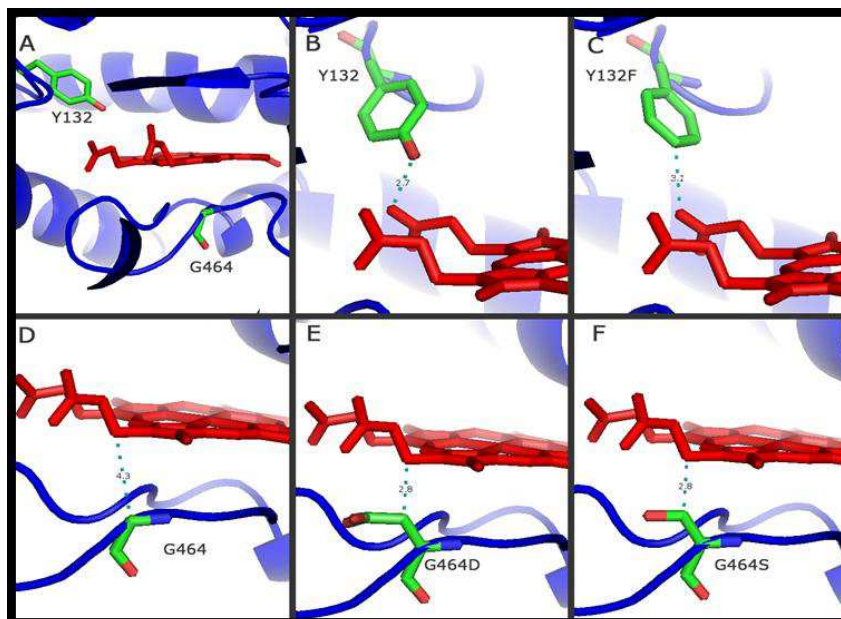


Figura 5.1. Posición de las mutaciones puntuales de Erg11p en *C. tropicalis*. A, B y D muestran la posición del grupo hemo con respecto a los residuos Y132 y G464 y la distancia con este (2,7 y 4,3 Å, respectivamente) en la cepa salvaje. Las figuras C y E señalan la posición y la distancia de los residuos mutados, Y132F y G464D (3,1 y 2,8 Å, respectivamente) en las cepas TP-13650 y CL-6835, respectivamente. La Figura F corresponde a una mutación G464S, descrita en *C. albicans* (Kelly y col., 1999). En verde se representa el átomo de carbono, en azul el de nitrógeno y en rojo el oxígeno y el grupo hemo en rojo. La distancia entre el átomo más cercano de los aminoácidos y el grupo hemo se indican con las líneas punteadas verdes. Y= tirosina, F=fenilalanina, G = glicina, D, ácido aspártico y S= serina.

Una mutación en la misma posición (G464S), identificada en *C. albicans*, conlleva una pérdida de afinidad por el FCZ con disminución parcial de la actividad catalítica de la enzima pero sin impedir la síntesis de ergosterol (Kelly y col., 1999). Estos resultados difieren de lo observado en la cepa CL-6835, ya que en nuestro caso no se produce la síntesis de ergosterol. La diferencia en la capacidad de síntesis de ergosterol entre estas cepas puede ser atribuida a que la sustitución de una glicina por un ácido aspártico no tiene el mismo efecto en la función de la enzima que la sustitución por una serina. Aunque la posición G464 no interacciona directamente con el azol, esta posición es importante para la conformación del entorno del grupo hemo (Podust y col., 2001). Así, el cambio de glicina por otro aminoácido, produciría una disminución de la flexibilidad que se requiere para los cambios conformacionales que se producen después de la unión al sustrato o al inhibidor. En este caso, el reemplazo de G464 por ácido aspártico parece afectar igualmente a la afinidad de la enzima tanto por el azol como por el sustrato, resultando en un bloqueo de la síntesis de ergosterol.

Posiblemente la carga negativa del ácido aspártico o a su mayor tamaño que resultaría en la producción de una gran perturbación en el entorno hemo y por ello la prevención de la unión a ambos, al sustrato y al inhibidor. Ésto podría ser confirmado evaluando la actividad catalítica de Erg11p en esta cepa. Aunque algunas publicaciones ya han descrito que la sustitución G464S en Erg11p en *C. albicans* afecta la actividad catalítica de Erg11p, aunque no se haya observado alteración en la afinidad por el sustrato en comparación con la proteína salvaje, (Kelly y col., 1999). Por otro lado, las cepas con resistencia cruzada a azoles y AmB tienen, además, mutaciones en el Erg3p, una enzima necesaria en la síntesis de ergosterol. Esto sugiere que la alteración en la síntesis de ergosterol en las cepas de *C. tropicalis* CL-6835 y ATCC 200956 tiene un efecto tan deletéreo para la levadura que solo aquellas con mutaciones en el Erg3p son capaces de sobrevivir. Por otro lado, el cambio Y132F en la cepa TP-13650 no alteró la síntesis de ergosterol. La presencia de la fenilalanina en la posición 132 en lugar de la tirosina conlleva la pérdida de un puente de hidrógeno normalmente formado entre el grupo hemo y la tirosina (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Este cambio modifica la unión del azol a la enzima sin alterar la actividad de la misma, como ha sido descrito para otra sustitución similar (Y132H) en *C. albicans* (Kelly y col., 1999; Park y col., 2011).

La vía de síntesis de ergosterol ha sido descrita en diferentes hongos (Alcazar-Fuoli y col., 2008; Martel y col., 2010; Hull y col., 2012) pero no en *C. tropicalis*. Nosotros hemos propuesto una vía de síntesis de ergosterol en esta especie basados en el perfil de esteroides de las cepas susceptible, la resistente a los azoles y aquellas con resistencia cruzada (azoles y AmB, **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) Las mutaciones en Erg11p y Erg3p conllevan a la ausencia de ergosterol y a la detección de diferentes metabolitos de la vía de síntesis del ergosterol. El incremento de lanosterol observado con las cepas de *C. tropicalis* es la consecuencia de la mutación con cambio de aminoácidos en Erg11p localizadas en sitios imprescindibles para una perfecta actividad de esta enzima.

El aumento de 14- α -metilfecosterol, un esteroide no tóxico para las levaduras, que les permite sobrevivir a pesar de la presencia de azoles, es el producto de mutaciones supresoras en el *ERG3*. El perfil de esteroides descrito en las cepas de *C. tropicalis* analizadas en este trabajo se han encontrado en otras levaduras con mutaciones en estos mismos genes (Geber y col., 1995; Pinjon y col., 2003; Hull y col., 2012; Morio y

col., 2012; Eddouzi y col., 2013) o en la combinación de mutaciones en *ERG11* y *ERG5* (Martel y col., 2010).

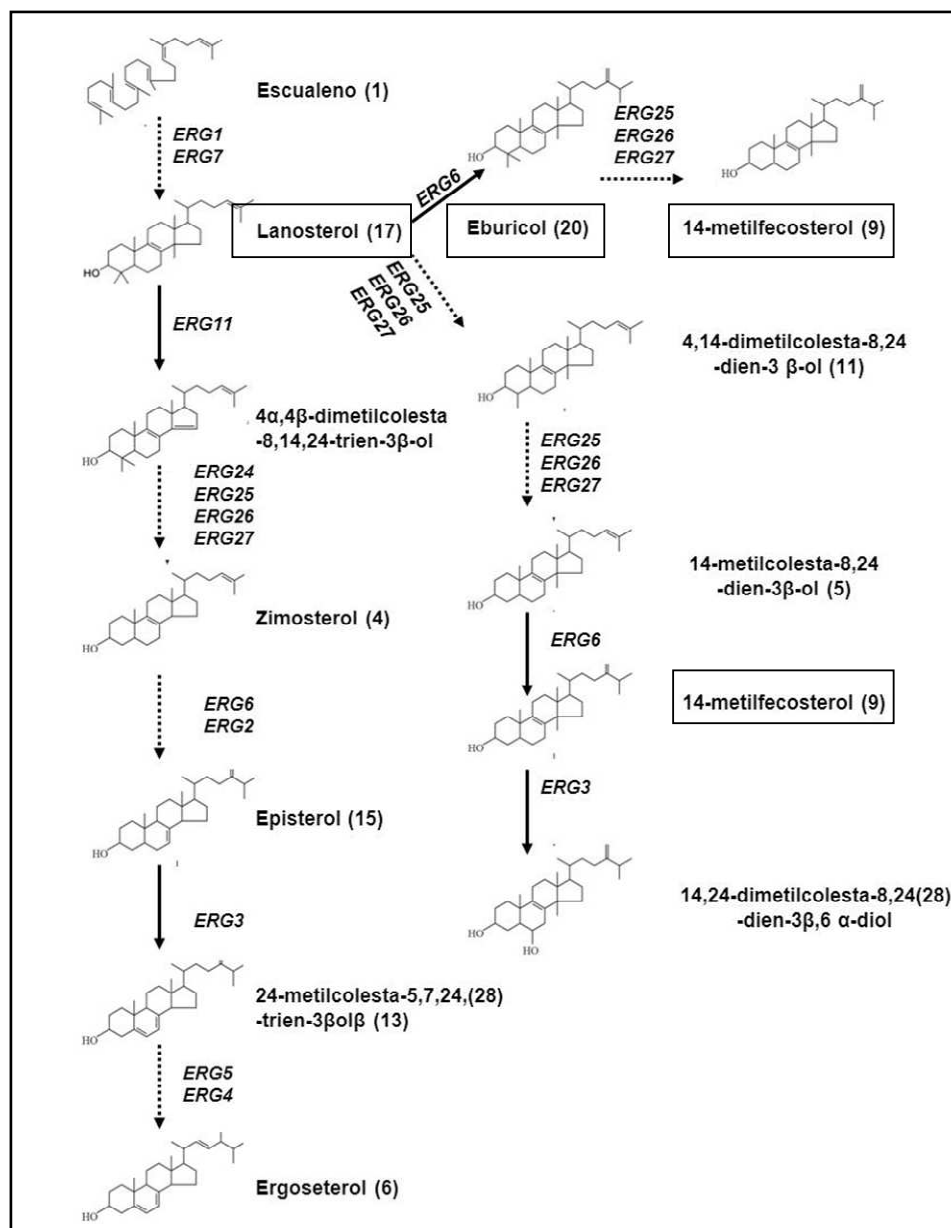


Figura 5.2. Representación esquemática de la vía de síntesis de ergosterol en *C. tropicalis*. Los principales esteroides que se acumularon en las cepas con mutaciones en el gen *ERG11* y en el *ERG3* se indican en recuadros. Los números entre paréntesis indican la posición en la OLas flechas punteadas indican la participación de varias enzimas y las sólidas de una sola enzima.

Las diferentes mutaciones en Erg3p y/o Erg11p sugieren su participación directa en los fenotipos de susceptibilidad en las cepas de *C. tropicalis* aunque no se puede descartar la participación de mecanismos de resistencia adicionales independientes de los descritos. La confirmación de este supuesto se lograría mediante reconstitución de la

resistencia utilizando modelos de expresión como se ha hecho en otros trabajos (Sanglard y Odds, 2002; Eddouzi y col., 2013).

Por otro lado, se conoce que mutaciones en *ERG3* actúan como supresores de mutaciones en el *ERG11* favoreciendo la viabilidad de *S. cerevisiae* con disrupción letal de este gen (Bard y col., 1993; Kelly y col., 1995). A su vez, en *S. cerevisiae* se han logrado mutantes del *ERG3* resistentes a FCZ con capacidad de revertir el fenotipo en presencia de un inhibidor de la Hsp90 (radicol) y de la calcineurina (ciclosporina A) otorgando un papel importante a la Hsp90-calcineurina en el mantenimiento de la mutación (Cowen y Lindquist, 2005). Esta información permite sugerir que la resistencia antifúngica es el resultado de la adaptación a condiciones de estrés en el que podrían actuar, de forma concomitante, diferentes mecanismos.

Existe evidencia de la interacción entre Erg3p y la fosforilación oxidativa en presencia de FCZ (Kontoyiannis, 2000). Nosotros encontramos relación entre resistencia cruzada AmB y azoles con la alteración de algunas funciones mitocondriales y mutaciones en el *ERG3*. Nuestros resultados no permiten definir si las alteraciones mitocondriales son consecuencia del defecto en la biosíntesis de ergosterol. Es posible que este esterol, forme parte de la membrana mitocondrial como ocurre en *P. pastoris* (Wriessnegger y col., 2009) y que su ausencia afecte la función mitocondrial. Pero también podría suceder que la alteración mitocondrial incida a su vez en la función de *ERG3*, ya que la mitocondria es importante para que esta enzima facilite la conversión de 14- α metilfecosterol en otro compuesto tóxico 14,24 dimetilcolesta-8,24(28)-dien-3 β -6 α -diol en presencia de azoles, participando en la acción fungistática de estos fármacos (Kontoyiannis, 2000; Sanglard y Odds, 2002).

La mitocondria, además de participar en la sensibilidad/resistencia antifúngica por la producción de ROS, es importante en la biosíntesis de ergosterol (Oliver y col., 2008). Estudios previos sugieren una relación estrecha entre la función mitocondrial, la biosíntesis del ergosterol y la sensibilidad /resistencia a la AmB como se ha observado en una mutante de *C. albicans* en la que cual se identificaron alteraciones funcionales de la mitocondria, deficiencia respiratoria, ausencia de ergosterol y resistencia a AmB (Geraghty y Kavanagh, 2003).

En el caso de *Candida* spp. el mecanismo de resistencia a los azoles más frecuente está relacionado con la disminución de las concentraciones de fármaco debido al aumento de expresión o activación de los genes que codifican bombas de flujo. Aunque, en los hongos, este mecanismo se relaciona principalmente con resistencia a los

azoles y no a la AmB, en aislados de *L. donovani* resistentes a AmB se ha descrito el aumento de la expresión de genes *MDR1* junto a otros factores que contribuyeron a la resistencia de este antifúngico (Purkait y col., 2012). En nuestro trabajo se investigó si, además de los mecanismos de resistencia identificados, existía activación de bombas de flujo utilizando Rodamina 6G como sustrato de las bombas MDR. En concordancia con otros autores, este mecanismo no se detectó en las cepas de *C. tropicalis* resistentes a AmB y/o fluconazol (Vandeputte y col., 2005; Jiang y col., 2013). Sin embargo, las cepas resistentes a AmB captaron más la sonda posiblemente por un cambio en la permeabilidad de la membrana celular como resultado de la alteración en la composición de esteroides de estas cepas.

Clásicamente, se ha considerado que la terapia combinada de la AmB con azoles no era apropiada, ya que ambas familias de antifúngicos tienen como diana al ergosterol. Sin embargo, el hecho de que la AmB también induce daño oxidativo unido a la inhibición de la síntesis de ergosterol por los azoles, se podría esperar un efecto sinérgico o aditivo entre estos antifúngicos lo que podría ser considerado para el planteamiento nuevas estrategias terapéuticas. De hecho, el efecto aditivo del tratamiento combinado de AmB y azoles ha sido demostrado en modelos murinos (Sugar y col., 1995; Barchiesi y col., 2000).

La importancia creciente de las infecciones fúngicas contrasta con la baja cantidad de antifúngicos disponibles, y como se ha destacado anteriormente, es improbable que surjan nuevas familias de antifúngicos en el futuro. El trabajo presentado en esta memoria demuestra que la investigación sobre los fármacos ya conocidos y caracterizados pueden ofrecer alternativas para mejorar los tratamientos actuales.

5.3. *Galleria mellonella*: un modelo alternativo para el estudio de virulencia fúngica y eficacia de antifúngicos

La información derivada de modelos experimentales se considera más relevante que los estudios *in vitro* en aspectos relacionado con la virulencia, la actividad de fármacos o en el desarrollo nuevas moléculas antifúngicas. En este sentido, los modelos murinos son los más utilizados para el estudio *in vivo* de todos estos parámetros. Sin embargo, el uso de mamíferos es complejo y costoso. Además, actualmente las autoridades competentes (en España, las Comunidades Autónomas) regulan el uso de estos modelos en mamíferos, por lo que se ha optado por modelos alternativos con menos implicaciones éticas, reservando la utilización de mamíferos a la confirmación de hallazgos más depurados a nivel de interacción huésped-parásito. Por ello, la

experimentación con de *G. mellonella* se ha estandarizado en los últimos años para realizar estudios preliminares de cribado.

5.3.1. Virulencia de *Candida tropicalis* y *Aspergillus* spp en *Galleria mellonella*

Candida tropicalis es una levadura clínicamente relevante dado el incremento en la incidencia de infecciones y la aparición de cepas resistentes a azoles (Chai y col., 2010) y a AmB (Rex y col., 1995; Warn y col., 2000; Warn y col., 2002). A pesar de la importancia de esta levadura, poco se conoce sobre los factores de virulencia y su interacción con el huésped. En este trabajo se ha evaluado la capacidad de *C. tropicalis* para causar infección en *G. mellonella* y se ha demostrado que las larvas de este insecto son susceptibles a la infección por la levadura así como lo son para otros hongos patógenos humanos (Brennan y col., 2002; Mylonakis y col., 2005; Coleman y col., 2011; Cheema y Christians, 2011; Garcia-Rodas y col., 2011). La infección de *G. mellonella* fue dependiente de la temperatura (30°C ó 37°C), del tamaño del inóculo y de la cepa. Nosotros además confirmamos que la diferencia observada en la virulencia, de acuerdo a la temperatura de incubación de las larvas infectadas, no era debido a diferencias en la tasa de crecimiento de las levaduras en función de la temperatura. Estos resultados fueron diferentes a los observados en *C. neoformans* (Mylonakis y col., 2005; Garcia-Rodas y col., 2011) ya que esta levadura fue más virulenta a 37°C a pesar de que el crecimiento a esta temperatura fue más lento que a 30°C. Nuestros resultados también contrastaron con los obtenidos con *C. krusei* (Scorzoni y col., 2013) ya que en este caso la virulencia de las cepas no fue dependiente de la temperatura de incubación de las larvas infectadas ni de la diferencia en el crecimiento de las levaduras a las dos temperaturas.

El desarrollo microbiano y la expresión de factores de virulencia microbiana son dependientes de la temperatura. Eventos celulares como el apareamiento, el cambio fenotípico, la resistencia antifúngica y la transición de micelio a levadura en *C. albicans*, dependen de la temperatura (Shapiro y Cowen, 2012). La mayor virulencia de *C. tropicalis* a 37°C observada en este trabajo, podría explicarse por la activación de factores de virulencia a esta temperatura. La importancia de la activación de factores de virulencia en levaduras viables se confirmó por la avirulencia de levaduras inactivadas por calor como había sido observado en otro estudio con *C. krusei* (Scorzoni y col., 2013). También la temperatura de incubación podría afectar a las larvas haciéndolas más sensibles a la infección, ya que la temperatura óptima para el crecimiento y desarrollo de este insecto es 30°C (Brennan y col., 2002).

El tamaño del inóculo fue otro factor que influyó en la virulencia de las cepas de *C. tropicalis*. A medida que incrementó el inóculo, las cepas fueron más virulentas. Sin embargo, la cepa ATCC 200956 requirió una mayor concentración de inóculo para lograr un efecto comparable a las demás cepas. Posiblemente el crecimiento más lento de esta cepa la hace menos virulenta. La virulencia dependiente de cepas igualmente había sido descrito en *G. mellonella* infectadas con *S. cerevisiae*, *Candida* spp. o con *H. capsulatum* (Cotter y col., 2000; Thomaz y col., 2013). En un modelo murino infectado con *C. tropicalis* también se ha observado que la virulencia puede ser dependiente de la cepa (Okawa y col., 2008). Por todo ello, es recomendable la estandarización de los inóculos para posteriores estudios con *G. mellonella*.

La melanización es un mecanismo de la respuesta inmune innata de *G. mellonella* y es el producto de la fenoloxidasa producida por los hemocitos ante la invasión de un microorganismo o la presencia un cuerpo extraño (Kavanagh y Reeves, 2004; Fuchs y Mylonakis, 2006; de Melo y col., 2013). Las larvas infectadas con las diferentes cepas de *C. tropicalis* se tornaron oscuras en respuesta a la inyección del inóculo, tanto cuando se utilizaron levaduras vivas como cuando se inocularon levaduras inactivadas con calor. Resultados similares se han publicado con larvas infectadas con *C. krusei* (Scorzoni y col., 2013). En nuestro caso, todas las larvas inoculadas con las diferentes cepas se pigmentaron. Sin embargo la melanización de las infectadas con la cepa ATCC 200956 sucedió de manera más prominente que en las demás. Este resultado indica que dicha cepa podría inducir una respuesta inmune más efectiva, lo que en parte explicaría su menor virulencia. Aunque desconocemos el mecanismo por el que la cepa ATCC 200956 induce mayor melanización de las larvas, es posible que los cambios de la pared observados en este aislado influyen en su reconocimiento por las células de *G. mellonella*. De hecho, condiciones que en *C. albicans* inducen acumulación y exposición de beta glucanos y quitina (como el tratamiento con caspofungina) también producen mayor melanización de las larvas (Rueda y col., 2014). Los β -1,3 glucanos son inmunogénicos tanto *in vitro* como *in vivo* y suelen estimular tanto una respuesta inflamatoria como antiinflamatoria (Chen y col., 2013).

En comparación con *A. fumigatus* (más virulento), la melanización temprana de las larvas fue observada de manera más evidente tras la infección con *A. lentulus* (menos virulento). En este caso no sabemos si existen diferencias en la composición de la pared entre estas especies.

La formación de hifas y/o pseudohifas en *Candida* spp. se considera un factor de virulencia por facilitar la adhesión a superficies biológicas, la invasión de tejidos y la

evasión de la fagocitosis (Romani y col., 2003; Chai y col., 2010). En este estudio, se encontró una relación directa entre la formación de pseudohifas y la virulencia. La cepa ATCC 200956 fue la menos virulenta y además formó filamentos más cortos dentro de las larvas que las cepas sensibles. Esta cepa además presentaba una mutación en el gen *ERG3*. La inactivación de la función del gen *ERG3* en *C. albicans* se ha asociado a la incapacidad de la levadura para formar filamentos y atenuación de la virulencia (Chau y col., 2005; Miyazaki y col., 2006; Alvarez-Rueda y col., 2011; Morio y col., 2012). En nuestro caso aunque tanto la cepa ATCC 200956 como la CL-6835 tenían mutación en el *ERG3* (S258F y S113G, respectivamente), solo la primera fue menos virulenta en *G. mellonella*. Es posible que la diferencia en el cambio de aminoácidos en Erg3p influya en la virulencia y/o que la delección del *ERG11* con un bloqueo funcional completo de Erg11p, esté atenuando la virulencia en la primera cepa. La inmunidad innata es la primera línea de defensa contra agentes invasores y es estructural y funcionalmente similar entre insectos y mamíferos (Salzet, 2001). Algunos de los hemocitos de *G. mellonella* cumplen funciones similares a las de los fagocitos humanos y son capaces de fagocitar microorganismos (Garcia-Rodas y col., 2011; Thomas y col., 2013). En este modelo, los hemocitos de *G. mellonella* fueron capaces de fagocitar *C. tropicalis*, como ocurre con otras levaduras (Coleman y col., 2011; Garcia-Rodas y col., 2011). Además, se observó disminución en la densidad hemocitaria (hemocitopenia) en las larvas infectadas en comparación con las inoculadas con PBS o con las no infectadas. La asociación entre la disminución de la población de hemocitos ya ha sido descrita en larvas infectadas con diferentes especies de *Candida* y con *A. fumigatus* (Bergin y col., 2003; Gomez-Lopez y col., 2014). La disminución en la población de hemocitos en la infección de *G. mellonella* podría ser el resultado del desplazamiento de las células al sitio de infección para formar nódulos alrededor de los elementos fúngicos, aunque también podría deberse a la muerte de los hemocitos tras la filamentación de las levaduras fagocitadas.

Aspergillus lentulus, a pesar de la similitud morfológica y genética con *A. fumigatus*, es una especie de crecimiento lento, menos virulento y su implicación en cuadros infecciosos de aspergilosis pulmonar aún no está claro. No obstante su estudio es importante por ser un microorganismo multiresistente y por su concomitancia en infecciones mixtas con *A. fumigatus* (Alhambra y col., 2008; Montenegro y col., 2009; Symoens y col., 2010). Recientemente, se ha demostrado que *A. lentulus* es capaz de causar infección en un modelo de inmunosupresión murino de aspergilosis pulmonar (Mellado y col., 2011). La infección de *G. mellonella* con conidias *A. fumigatus* o *A. lentulus* fue similar al observado en ratones, ya que ambas especies produjeron muerte

del huésped a 37°C. Sin embargo *A. lentulus* fue menos virulento que *A. fumigatus*. En ambos modelos, la infección de las larvas también fue dependiente del tamaño del inóculo, de manera similar a lo que había ocurrido en ratones (Mellado y col., 2011). *Galleria mellonella* es también susceptible a la infección por otros hongos filamentosos de importancia clínica, como *Fusarium* spp. Sin embargo, en *Fusarium* spp. aunque la infección también es dependiente del tamaño del inóculo, fue más virulento a 30°C que a 37°C (Coleman y col., 2011; Navarro-Velasco y col., 2011). Esto puede explicar que las infecciones causadas por especies de éste género sean más frecuentes en localizaciones anatómicas en las que la temperatura suele ser más baja como son la piel y las uñas (Nucci y Anaissie, 2007).

5.4. Eficacia de antifúngicos en larvas de *G. mellonella* infectadas con *C. tropicalis* y *Aspergillus* spp

La evaluación de la eficacia de medicamentos y de parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos es de interés clínico cuando el objetivo es la búsqueda, desarrollo o modificación de fármacos con el fin de lograr mejores efectos o menor toxicidad. A pesar de que *G. mellonella* es un organismo mucho más simple que un mamífero, se ha utilizado para investigar la eficacia de diferentes antimicrobianos y la correlación con la susceptibilidad *in vitro* (Mylonakis y col., 2005; Rowan y col., 2009; Thomas y col., 2013). Además, recientemente se ha demostrado la utilidad de este modelo para evaluar propiedades farmacocinéticas de antibacterianos relevantes en la práctica clínica, mostrando resultados que se aproximaron a los observados en el humano (Thomas y col., 2013). En nuestro trabajo, *G. mellonella* se utilizó para evaluar la eficacia de diferentes antifúngicos en larvas infectadas con *C. tropicalis*, *A. fumigatus* y *A. lentulus* y así establecer su correlación con el fenotipo de susceptibilidad *in vitro* en las tres especies. Todos los antifúngicos evaluados (FCZ, VCZ, AmB y ANF) protegieron a las larvas de la infección causada por la cepa ATCC 750 de *C. tropicalis*. Además, la respuesta fue dosis dependiente con los diferentes antifúngicos. La resistencia *in vitro* a FCZ de la cepa TP-13650, se correlacionó con el fallo del tratamiento con FCZ y una menor supervivencia. Asimismo, las larvas infectadas con cepas resistentes a los azoles y a AmB (CL-6835 y ATCC 200956) no respondieron al tratamiento con ambos antifúngicos. En todos los casos el tratamiento con ANF prolongó la supervivencia de las larvas infectadas independiente del fenotipo *in vitro* para los otros antifúngicos. Esta equinocandina se usó como control de la eficacia y para comprobar si el modelo servía para reproducir el fenotipo identificado *in vitro*.

La eficacia de la AmB y el VCZ en larvas de *G. mellonella* infectadas con *A. fumigatus* y *A. lentulus*, se correspondió con el patrón de susceptibilidad *in vitro*. Ambos antifúngicos protegieron las larvas de la infección con *A. fumigatus* e incrementaron la supervivencia con respecto al control infectado y no tratado. Por el contrario, no protegieron de la infección por *A. lentulus*, concordando con el fenotipo de susceptibilidad *in vitro*. Este mismo modelo ha sido utilizado para estudiar la eficacia de AmB y FCZ en larvas infectadas con cepas de *Fusarium*. En este caso los resultados mostraron que la supervivencia de las larvas infectadas y tratadas con AmB es mayor a las tratadas con FCZ. Sin embargo el modelo falló para demostrar la eficacia de mancozeb, un fungicida usado en agricultura contra *Fusarium* spp., a pesar de la susceptibilidad *in vitro* (Coleman y col., 2011).

Galleria mellonella también es útil para investigar la eficacia de combinación de fármacos. El sinergismo entre caspofungina y geldanamicina (un inhibidor de la chaperona Hsp90) contra *A. fumigatus* resistente a caspofungina y entre FCZ con otros inhibidores de la Hsp90 contra *C. albicans*, ha sido confirmado en *G. mellonella* (Cowen y col., 2009). Asimismo, la acción sinérgica entre AmB y flucitosina frente a *C. neoformans*, se ha validado en éste modelo (de Melo y col., 2013).

En conclusión, *G. mellonella* es un modelo de huésped alternativo sencillo que facilita la evaluación de la patogenia de los hongos así como la correlación de la sensibilidad *in vitro* con la eficacia *in vivo* de fármacos antifúngicos. Además, puede ser útil para seleccionar, a través de un cribado previo, mutantes o fármacos para posterior evaluación en vertebrados con el objetivo de reducir el impacto ético de la investigación en micología. Asimismo, este modelo permite realizar un gran número de experimentos en un periodo de tiempo relativamente corto, lo que permite plantear líneas de investigación que serían de difícil realización con animales superiores. Aunque este modelo presenta varias ventajas y puede proporcionar idea de la virulencia y de la efectividad de medicamentos, existen limitaciones para su uso como es la temperatura óptima de crecimiento y desarrollo la cual no se corresponde con la fisiológica del humano (37°C), dificultando la interpretación de los resultados. Por otro lado, este invertebrado no presenta respuesta inmune adaptativa por lo tanto el modelo no sería adecuado para estudios más complejos relacionados con este tipo de respuesta. De la misma manera, tampoco sería un modelo idóneo, dada la simplicidad anatómica y fisiológica, para inferir sobre la toxicidad de fármacos (nefrotóxicos, hepatotóxicos o tóxicos para órganos complejos). De hecho, en nuestras condiciones, la AmB no fue tóxica en *G. mellonella* a concentraciones que en humanos son nefrotóxicas. Estos

resultados hacen necesario confirmar los resultados obtenidos en *G. mellonella* en un modelo más complejo antes de ser extrapolados al hombre. Además hacen pensar que el reemplazo de los vertebrados por invertebrados en experimentación parece una opción lejana.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

- 1.- La inducción de estrés oxidativo en las células fúngicas participa en el efecto fungicida de la AmB.
- 2.- La disminución en la producción de ROS y/o la activación de mecanismos antioxidantes están relacionados con la resistencia a este antifúngico incluso en ausencia de ergosterol. Otros factores como el cambio en el potencial de membrana mitocondrial, un incremento en el grosor de la pared, mayor detección de β -1,3-glucanos, la resistencia al rojo Congo y el retraso en el crecimiento también se identificaron en las cepas resistentes.
- 3.- La resistencia cruzada entre AmB y azoles en *C. tropicalis* es el resultado de la ausencia de ergosterol en la membrana celular como consecuencia de mutaciones en enzimas clave de la ruta de biosíntesis del ergosterol (Erg3p y Erg11p).
- 4.- *Galleria mellonella* es un modelo alternativo válido para la investigación de diferentes aspectos de interés en la micología clínica como la virulencia fúngica y la evaluación *in vivo* de la eficacia y toxicidad de antifúngicos.
- 5.- La sensibilidad o resistencia a antifúngicos *in vitro* se correlaciona *in vivo* con la respuesta o el fallo terapéutico en el modelo de *Galleria mellonella*.

REFERENCIAS

7. REFERENCIAS

- Abbas, J., G. P. Bodey, H. A. Hanna, M. Mardani, E. Girgawy, D. Abi-Said et al.** (2000). *Candida krusei* fungemia. An escalating serious infection in immunocompromised patients. Arch Intern Med 160(17): 2659-64.
- Aebi, H.** (1984). Catalase in vitro. Methods Enzymol 105: 121-6.
- Aerts, A. M., I. E. Francois, E. M. Meert, Q. T. Li, B. P. Cammue and K. Thevissen** (2007). The antifungal activity of RsAFP2, a plant defensin from raphanus sativus, involves the induction of reactive oxygen species in *Candida albicans*. J Mol Microbiol Biotechnol 13(4): 243-7.
- Alastruey-Izquierdo, A., E. Mellado, T. Pelaez, J. Peman, S. Zapico, M. Alvarez et al.** (2013). Population-based survey of filamentous fungi and antifungal resistance in Spain (FILPOP Study). Antimicrob Agents Chemother 57(7): 3380-7.
- Alcazar-Fuoli, L., I. Cuesta, J. L. Rodriguez-Tudela, M. Cuenca-Estrella, D. Sanglard and E. Mellado** (2011). Three-dimensional models of 14alpha-sterol demethylase (Cyp51A) from *Aspergillus lentulus* and *Aspergillus fumigatus*: an insight into differences in voriconazole interaction. Int J Antimicrob Agents 38(5): 426-34.
- Alcazar-Fuoli, L., E. Mellado, A. Alastruey-Izquierdo, M. Cuenca-Estrella and J. L. Rodriguez-Tudela** (2008). *Aspergillus* section Fumigati: antifungal susceptibility patterns and sequence-based identification. Antimicrob Agents Chemother 52(4): 1244-51.
- Alcazar-Fuoli, L., E. Mellado, G. Garcia-Effron, J. F. Lopez, J. O. Grimalt, J. M. Cuenca-Estrella et al.** (2008). Ergosterol biosynthesis pathway in *Aspergillus fumigatus*. Steroids 73(3): 339-47.
- Alhambra, A., M. Catalan, M. D. Moragues, S. Brena, J. Ponton, J. C. Montejo et al.** (2008). Isolation of *Aspergillus lentulus* in Spain from a critically ill patient with chronic obstructive pulmonary disease. Rev Iberoam Micol 25(4): 246-9.
- Almirante, B., D. Rodriguez, M. Cuenca-Estrella, M. Almela, F. Sanchez, J. Ayats et al.** (2006). Epidemiology, risk factors, and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. J Clin Microbiol 44(5): 1681-5.
- Almirante, B., D. Rodriguez, B. J. Park, M. Cuenca-Estrella, A. M. Planes, M. Almela et al.** (2005). Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, barcelona, Spain, from 2002 to 2003. J Clin Microbiol 43(4): 1829-35.
- Alvarez-Rueda, N., A. Fleury, F. Morio, F. Pagniez, L. Gastinel and P. Le Pape** (2011). Amino acid substitutions at the major insertion loop of *Candida albicans* sterol 14alpha-demethylase are involved in fluconazole resistance. PLoS One 6(6): e21239.
- Alves, S. H., E. Boff, P. Pozzatti, L. A. Scheid, E. de Loreto, L. T. Ottoneli Oliveira et al.** (2009). Relationship between susceptibility of *Candida* spp. isolates to amphotericin B and death or survival of patients with candidemia episodes. Mycopathologia 167(2): 65-71.
- Antoniadou, A., H. A. Torres, R. E. Lewis, J. Thornby, G. P. Bodey, J. P. Tarrand et al.** (2003). Candidemia in a tertiary care cancer center: in vitro susceptibility and its association with outcome of initial antifungal therapy. Medicine (Baltimore) 82(5): 309-21.
- Arana, D. M., R. Alonso-Monge, C. Du, R. Calderone and J. Pla** (2007). Differential susceptibility of mitogen-activated protein kinase pathway mutants to oxidative-mediated killing by phagocytes in the fungal pathogen *Candida albicans*. Cell Microbiol 9(7): 1647-59.

- Arendrup, M., T. Horn and N. Frimodt-Moller** (2002). In vivo pathogenicity of eight medically relevant *Candida* species in an animal model. *Infection* 30(5): 286-91.
- Arendrup, M. C.** (2013). *Candida* and candidaemia. Susceptibility and epidemiology. *Dan Med J* 60(11): B4698.
- Arendrup, M. C., T. Boekhout, M. Akova, J. F. Meis, O. A. Cornely and O. Lortholary** (2014). ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of rare invasive yeast infections. *Clin Microbiol Infect* 20 Suppl 3: 76-98.
- Arendrup, M. C., M. Cuenca-Estrella, C. Lass-Flörl and W. Hope** (2012). EUCAST technical note on the EUCAST definitive document EDef 7.2: method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts EDef 7.2 (EUCAST-AFST). *Clin Microbiol Infect* 18(7): E246-7.
- Arendrup, M. C., E. Mavridou, K. L. Mortensen, E. Snelders, N. Frimodt-Moller, H. Khan et al.** (2010). Development of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* during azole therapy associated with change in virulence. *PLoS One* 5(4): e10080.
- Arikan, S., S. Ozdek, Z. Aktas, A. Dincel and B. Hasanreisoglu** (2013). Vitreous and aqueous penetration of intravitreally and orally administered moxifloxacin in an experimental rabbit model of fungal endophthalmitis. *J Pharm Pharmacol* 65(5): 659-64.
- Arthington-Skaggs, B. A., D. W. Warnock and C. J. Morrison** (2000). Quantitation of *Candida albicans* ergosterol content improves the correlation between in vitro antifungal susceptibility test results and in vivo outcome after fluconazole treatment in a murine model of invasive candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother* 44(8): 2081-5.
- Bader, O., M. Weig, U. Reichard, R. Lugert, M. Kuhns, M. Christner et al.** (2013). cyp51A-Based mechanisms of *Aspergillus fumigatus* azole drug resistance present in clinical samples from Germany. *Antimicrob Agents Chemother* 57(8): 3513-7.
- Balajee, S. A., J. L. Gribskov, E. Hanley, D. Nickle and K. A. Marr** (2005). *Aspergillus lentulus* sp. nov., a new sibling species of *A. fumigatus*. *Eukaryot Cell* 4(3): 625-32.
- Barchiesi, F., A. M. Schimizzi, F. Caselli, A. Novelli, S. Fallani, D. Giannini et al.** (2000). Interactions between triazoles and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* 44(9): 2435-41.
- Bard, M., N. D. Lees, T. Turi, D. Craft, L. Cofrin, R. Barbuch et al.** (1993). Sterol synthesis and viability of erg11 (cytochrome P450 lanosterol demethylase) mutations in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Lipids* 28(11): 963-7.
- Bassetti, M., L. Taramasso, E. Nicco, M. P. Molinari, M. Mussap and C. Viscoli** (2011). Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility and outcome of nosocomial candidemia in a tertiary care hospital in Italy. *PLoS One* 6(9): e24198.
- Baxter, M. and G. Illston** (1980). Temperature relationships of fungi isolated at low temperatures from soils and other substrates. *Mycopathologia* 72:: 21-25
- Beckman, K. B. and B. N. Ames** (1998). Mitochondrial aging: open questions. *Ann N Y Acad Sci* 854: 118-27.
- Belenky, P., D. Camacho and J. J. Collins** (2013). Fungicidal drugs induce a common oxidative-damage cellular death pathway. *Cell Rep* 3(2): 350-8.
- Bennett, J. E., K. Izumikawa and K. A. Marr** (2004). Mechanism of increased fluconazole resistance in *Candida glabrata* during prophylaxis. *Antimicrob Agents Chemother* 48(5): 1773-7.

- Bergin, D., M. Brennan and K. Kavanagh** (2003). Fluctuations in haemocyte density and microbial load may be used as indicators of fungal pathogenicity in larvae of *Galleria mellonella*. *Microbes Infect* 5(15): 1389-95.
- Bidla, G., T. Hauling, M. S. Dushay and U. Theopold** (2009). Activation of insect phenoloxidase after injury: endogenous versus foreign elicitors. *J Innate Immun* 1(4): 301-8.
- Bilinski, T., J. Litwinska, M. Blaszczyński and A. Bajus** (1989). Superoxide dismutase deficiency and the toxicity of the products of autooxidation of polyunsaturated fatty acids in yeast. *Biochim Biophys Acta* 1001(1): 102-6.
- Binder, U. and C. Lass-Flörl** (2011). Epidemiology of invasive fungal infections in the mediterranean area. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 3(1): e20110016.
- Blum, G., B. Kainzner, K. Grif, H. Dietrich, B. Zelger, T. Sonnweber et al.** (2013). In vitro and in vivo role of heat shock protein 90 in Amphotericin B resistance of *Aspergillus terreus*. *Clin Microbiol Infect* 19(1): 50-5.
- Blum, G., S. Perkhofer, H. Haas, M. Schrettl, R. Wurzner, M. P. Dierich et al.** (2008). Potential basis for amphotericin B resistance in *Aspergillus terreus*. *Antimicrob Agents Chemother* 52(4): 1553-5.
- Bolard, J.** (1986). How do the polyene macrolide antibiotics affect the cellular membrane properties? *Biochim Biophys Acta* 864(3-4): 257-304.
- Boronat, S., A. Domenech, E. Paulo, I. A. Calvo, S. Garcia-Santamarina, P. Garcia et al.** (2014). Thiol-based HO signalling in microbial systems. *Redox Biol* 2: 395-99.
- Boutati, E. I. and E. J. Anaissie** (1997). *Fusarium*, a significant emerging pathogen in patients with hematologic malignancy: ten years' experience at a cancer center and implications for management. *Blood* 90(3): 999-1008.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54.
- Brajtburg, J., S. Elberg, G. S. Kobayashi and G. Medoff** (1989). Effects of ascorbic acid on the antifungal action of amphotericin B. *J Antimicrob Chemother* 24(3): 333-7.
- Brajtburg, J., W. G. Powderly, G. S. Kobayashi and G. Medoff** (1990). Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action. *Antimicrob Agents Chemother* 34(2): 183-8.
- Brennan, M., D. Y. Thomas, M. Whiteway and K. Kavanagh** (2002). Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. *FEMS Immunol Med Microbiol* 34(2): 153-7.
- Brothers, K. M., Z. R. Newman and R. T. Wheeler** (2011). Live imaging of disseminated candidiasis in zebrafish reveals role of phagocyte oxidase in limiting filamentous growth. *Eukaryot Cell* 10(7): 932-44.
- Brown, S. M., L. T. Campbell and J. K. Lodge** (2007). *Cryptococcus neoformans*, a fungus under stress. *Curr Opin Microbiol* 10(4): 320-5.
- Byrnes, E. J., 3rd, K. H. Bartlett, J. R. Perfect and J. Heitman** (2011). *Cryptococcus gattii*: an emerging fungal pathogen infecting humans and animals. *Microbes Infect* 13(11): 895-907.
- Cabiscol, E., E. Piulats, P. Echave, E. Herrero and J. Ros** (2000). Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 275(35): 27393-8.

- Canas-Gutierrez, G. P., M. J. Angarita-Velasquez, J. M. Restrepo-Florez, P. Rodriguez, C. X. Moreno and R. Arango** (2009). Analysis of the CYP51 gene and encoded protein in propiconazole-resistant isolates of *Mycosphaerella fijiensis*. *Pest Manag Sci* 65(8): 892-9.
- Cao, Y., Z. Zhu, X. Chen, X. Yao, L. Zhao, H. Wang et al.** (2013). Effect of amphotericin B on the metabolic profiles of *Candida albicans*. *J Proteome Res* 12(6): 2921-32.
- Casadevall, A. and L. A. Pirofski** (2003). The damage-response framework of microbial pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 1(1): 17-24.
- Castellani, A.** (1910.). Observations on "tropical broncho-oidiosis". *Br. Med. J.* 2: 868-869, 1910. *Br. Med. J.* 2: 868-69.
- Cleary, I. A., P. Mulabagal, S. M. Reinhard, N. P. Yadev, C. Murdoch, M. H. Thornhill et al.** (2010). Pseudohyphal regulation by the transcription factor Rfg1p in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 9(9): 1363-73.
- Coleman, J. J., M. Muhammed, P. V. Kasperkovitz, J. M. Vyas and E. Mylonakis** (2011). *Fusarium* pathogenesis investigated using *Galleria mellonella* as a heterologous host. *Fungal Biol* 115(12): 1279-89.
- Colombo, A. L., A. L. Ngai, M. Bourque, S. K. Bradshaw, K. M. Strohmaier, A. F. Taylor et al.** (2010). Caspofungin use in patients with invasive candidiasis caused by common non-albicans *Candida* species: review of the caspofungin database. *Antimicrob Agents Chemother* 54(5): 1864-71.
- Colombo, A. L., A. C. Padovan and G. M. Chaves** (2011). Current knowledge of *Trichosporon* spp. and Trichosporonosis. *Clin Microbiol Rev* 24(4): 682-700.
- Collinson, L. P. and I. W. Dawes** (1992). Inducibility of the response of yeast cells to peroxide stress. *J Gen Microbiol* 138(2): 329-35.
- Cotter, G., S. Doyle and K. Kavanagh** (2000). Development of an insect model for the in vivo pathogenicity testing of yeasts. *FEMS Immunol Med Microbiol* 27(2): 163-9.
- Cowen, L. E. and S. Lindquist** (2005). Hsp90 potentiates the rapid evolution of new traits: drug resistance in diverse fungi. *Science* 309(5744): 2185-9.
- Cowen, L. E., S. D. Singh, J. R. Kohler, C. Collins, A. K. Zaas, W. A. Schell et al.** (2009). Harnessing Hsp90 function as a powerful, broadly effective therapeutic strategy for fungal infectious disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(8): 2818-23.
- Cowen, L. E. and W. J. Steinbach** (2008). Stress, drugs, and evolution: the role of cellular signaling in fungal drug resistance. *Eukaryot Cell* 7(5): 747-64.
- Cramer, R., M. Weichel, S. Fluckiger, A. G. Glaser and C. Rhyner** (2006). Fungal allergies: a yet unsolved problem. *Chem Immunol Allergy* 91: 121-33.
- Cuenca-Estrella, M., A. Gomez-Lopez, I. Cuesta, O. Zaragoza, E. Mellado and J. L. Rodriguez-Tudela** (2011). Frequency of voriconazole resistance in vitro among Spanish clinical isolates of *Candida* spp. According to breakpoints established by the Antifungal Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *Antimicrob Agents Chemother* 55(4): 1794-7.
- Chai, L. Y., D. W. Denning and P. Warn** (2010). *Candida tropicalis* in human disease. *Crit Rev Microbiol* 36(4): 282-98.
- Chamilos, G., M. S. Lionakis, R. E. Lewis, J. L. Lopez-Ribot, S. P. Saville, N. D. Albert et al.** (2006). *Drosophila melanogaster* as a facile model for large-scale studies of virulence mechanisms and antifungal drug efficacy in *Candida* species. *J Infect Dis* 193(7): 1014-22.

- Chapeland-Leclerc, F., C. Hennequin, N. Papon, T. Noel, A. Girard, G. Socie et al.** (2010). Acquisition of flucytosine, azole, and caspofungin resistance in *Candida glabrata* bloodstream isolates serially obtained from a hematopoietic stem cell transplant recipient. *Antimicrob Agents Chemother* 54(3): 1360-2.
- Chau, A. S., M. Gurnani, R. Hawkinson, M. Laverdiere, A. Cacciapuoti and P. M. McNicholas** (2005). Inactivation of sterol Delta5,6-desaturase attenuates virulence in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 49(9): 3646-51.
- Chau, A. S., C. A. Mendrick, F. J. Sabatelli, D. Loeberberg and P. M. McNicholas** (2004). Application of real-time quantitative PCR to molecular analysis of *Candida albicans* strains exhibiting reduced susceptibility to azoles. *Antimicrob Agents Chemother* 48(6): 2124-31.
- Chauhan, N., J. P. Latge and R. Calderone** (2006). Signalling and oxidant adaptation in *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Nat Rev Microbiol* 4(6): 435-44.
- Cheema, M. S. and J. K. Christians** (2011). Virulence in an insect model differs between mating types in *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol* 49(2): 202-7.
- Chen, T. C., Y. H. Chen, Y. C. Chen and P. L. Lu** (2012). Fluconazole exposure rather than clonal spreading is correlated with the emergence of *Candida glabrata* with cross-resistance to triazole antifungal agents. *Kaohsiung J Med Sci* 28(6): 306-15.
- Chen, W. C., D. L. Chou and D. S. Feingold** (1978). Dissociation between ion permeability and the lethal action of polyene antibiotics on *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 13(6): 914-7.
- Chen, Y., L. Dong, D. Weng, F. Liu, L. Song, C. Li et al.** (2013). 1,3-beta-glucan affects the balance of Th1/Th2 cytokines by promoting secretion of anti-inflammatory cytokines in vitro. *Mol Med Rep* 8(2): 708-12.
- da Silva, C. R., J. B. de Andrade Neto, J. J. Sidrim, M. R. Angelo, H. I. Magalhaes, B. C. Cavalcanti et al.** (2013). Synergistic effects of amiodarone and fluconazole on *Candida tropicalis* resistant to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 57(4): 1691-700.
- Dagenais, T. R. and N. P. Keller** (2009). Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 22(3): 447-65.
- Dai, B. D., Y. Y. Cao, S. Huang, Y. G. Xu, P. H. Gao, Y. Wang et al.** (2009). Baicalein induces programmed cell death in *Candida albicans*. *J Microbiol Biotechnol* 19(8): 803-9.
- Dannaoui, E., E. Borel, F. Persat, M. A. Piens and S. Picot** (2000). Amphotericin B resistance of *Aspergillus terreus* in a murine model of disseminated aspergillosis. *J Med Microbiol* 49(7): 601-6.
- de Brucker, K., A. Bink, E. Meert, B. P. Cammue and K. Thevissen** (2013). Potentiation of antibiofilm activity of amphotericin B by superoxide dismutase inhibition. *Oxid Med Cell Longev* 2013: 704654.
- de Dios, C. H., E. Roman, R. A. Monge and J. Pla** (2010). The role of MAPK signal transduction pathways in the response to oxidative stress in the fungal pathogen *Candida albicans*: implications in virulence. *Curr Protein Pept Sci* 11(8): 693-703.
- de Melo, N. R., A. Abdrahman, C. Greig, K. Mukherjee, C. Thornton, N. A. Ratcliffe et al.** (2013). Myriocin significantly increases the mortality of a non-mammalian model host during *Candida pathogenesis*. *PLoS One* 8(11): e78905.
- Del Palacio, A., J. Villar and A. Alhambra** (2009). [Epidemiology of invasive candidiasis in pediatric and adult populations]. *Rev Iberoam Micol* 26(1): 2-7.
- Denning, D. W.** (2003). Echinocandin antifungal drugs. *Lancet* 362(9390): 1142-51.

- Díaz-Guerra, T. M., E. Mellado, M. Cuenca-Estrella and J. L. Rodríguez-Tudela** (2003). A point mutation in the 14 α -sterol demethylase gene *cyp51A* contributes to itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 47(3): 1120-4.
- Dromer, F., S. Mathoulin-Pelissier, O. Launay and O. Lortholary** (2007). Determinants of disease presentation and outcome during cryptococcosis: the CryptoA/D study. *PLoS Med* 4(2): e21.
- Dujon, B., D. Sherman, G. Fischer, P. Durrens, S. Casaregola, I. Lafontaine et al.** (2004). Genome evolution in yeasts. *Nature* 430(6995): 35-44.
- Eddouzi, J., J. E. Parker, L. A. Vale-Silva, A. Coste, F. Ischer, S. Kelly et al.** (2013). Molecular mechanisms of drug resistance in clinical *Candida* species isolated from Tunisian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 57(7): 3182-93.
- Eissenberg, L. G., W. E. Goldman and P. H. Schlesinger** (1993). *Histoplasma capsulatum* modulates the acidification of phagolysosomes. *J Exp Med* 177(6): 1605-11.
- Esnakula, A. K., I. Summers and T. J. Naab** (2013). Fatal disseminated fusarium infection in a human immunodeficiency virus positive patient. *Case Rep Infect Dis* 2013: 379320.
- Fallon, J., J. Kelly and K. Kavanagh** (2012). *Galleria mellonella* as a model for fungal pathogenicity testing. *Methods Mol Biol* 845: 469-85.
- Farr, S. B. and T. Kogoma** (1991). Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol Rev* 55(4): 561-85.
- Fera, M. T., E. La Camera and A. De Sarro** (2009). New triazoles and echinocandins: mode of action, in vitro activity and mechanisms of resistance. *Expert Rev Anti Infect Ther* 7(8): 981-98.
- Fernandez, M. S., F. D. Rojas, M. E. Cattana, L. Sosa Mde, M. L. Mangiaterra and G. E. Giusiano** (2013). *Aspergillus terreus* complex: an emergent opportunistic agent of Onychomycosis. *Mycoses* 56(4): 477-81.
- Ferreira, G. F., M. Baltazar Lde, J. R. Santos, A. S. Monteiro, L. A. Fraga, M. A. Resende-Stoianoff et al.** (2013). The role of oxidative and nitrosative bursts caused by azoles and amphotericin B against the fungal pathogen *Cryptococcus gattii*. *J Antimicrob Chemother* 68(8): 1801-11.
- Finkelstein, A. and R. Holz** (1973). Aqueous pores created in thin lipid membranes by the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B. *Membranes* 2: 377-408.
- Fontaine, T., C. Simenel, G. Dubreucq, O. Adam, M. Delepierre, J. Lemoine et al.** (2000). Molecular organization of the alkali-insoluble fraction of *Aspergillus fumigatus* cell wall. *J Biol Chem* 275(52): 41528.
- Forastiero, A., A. C. Mesa-Arango, A. Alastruey-Izquierdo, L. Alcazar-Fuoli, L. Bernal-Martinez, T. Pelaez et al.** (2013). *Candida tropicalis* antifungal cross-resistance is related to different azole target (Erg11p) modifications. *Antimicrob Agents Chemother* 57(10): 4769-81.
- Formal, S. B., T. H. Kent, H. C. May, A. Palmer, S. Falkow and E. H. LaBrec** (1966). Protection of monkeys against experimental shigellosis with a living attenuated oral polyvalent dysentery vaccine. *J Bacteriol* 92(1): 17-22.
- Fortun, J., J. Carratala, J. Gavalda, M. Lizasoain, M. Salavert, R. de la Camara et al.** (2011). [Guidelines for the treatment of invasive fungal disease by *Aspergillus* spp. and other fungi issued by the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC). 2011 Update]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 29(6): 435-54.

- Fries, B. and G. Cox** (2010). Cryptococcosis in AIDA. Cryptococcus: From Human Pathogen To Model Yeast. J. Heitman, T. Kozel, K. Kwon-Chung, J. Perfect and A. Casadevall, ASM Press, Washington, DC.
- Fuchs, B. B. and E. Mylonakis** (2006). Using non-mammalian hosts to study fungal virulence and host defense. *Curr Opin Microbiol* 9(4): 346-51.
- Fuchs, B. B., E. O'Brien, J. B. Khoury and E. Mylonakis** (2010). Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. *Virulence* 1(6): 475-82.
- Fukuoka, T., D. A. Johnston, C. A. Winslow, M. J. de Groot, C. Burt, C. A. Hitchcock et al.** (2003). Genetic basis for differential activities of fluconazole and voriconazole against *Candida krusei*. *Antimicrob Agents Chemother* 47(4): 1213-9.
- Gabaldon, T., T. Martin, M. Marcet-Houben, P. Durrens, M. Bolotin-Fukuhara, O. Lespinet et al.** (2013). Comparative genomics of emerging pathogens in the *Candida glabrata* clade. *BMC Genomics* 14: 623.
- Gago, S., R. Garcia-Rodas, I. Cuesta, E. Mellado and A. Alastruey-Izquierdo** (2014). *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* virulence in the non-conventional host *Galleria mellonella*. *Virulence* 5(2): 278-85.
- Gale, E. F., A. M. Johnson, D. Kerridge and T. Y. Koh** (1975). Factors affecting the changes in amphotericin sensitivity of *Candida albicans* during growth. *J Gen Microbiol* 87(1): 20-36.
- Garcia-Effron, G., S. K. Katiyar, S. Park, T. D. Edlind and D. S. Perlin** (2008). A naturally occurring proline-to-alanine amino acid change in Fks1p in *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* accounts for reduced echinocandin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* 52(7): 2305-12.
- Garcia-Rodas, R., A. Casadevall, J. L. Rodriguez-Tudela, M. Cuenca-Estrella and O. Zaragoza** (2011). *Cryptococcus neoformans* capsular enlargement and cellular gigantism during *Galleria mellonella* infection. *PLoS One* 6(9): e24485.
- Garcia-Rodas, R., F. Gonzalez-Camacho, J. L. Rodriguez-Tudela, M. Cuenca-Estrella and O. Zaragoza** (2011). The interaction between *Candida krusei* and murine macrophages results in multiple outcomes, including intracellular survival and escape from killing. *Infect Immun* 79(6): 2136-44.
- Gazzoni, A. F., J. Capilla, E. Mayayo and J. Guarro** (2012). Efficacy of intrathecal administration of liposomal amphotericin B combined with voriconazole in a murine model of cryptococcal meningitis. *Int J Antimicrob Agents* 39(3): 223-7.
- Geber, A., C. A. Hitchcock, J. E. Swartz, F. S. Pullen, K. E. Marsden, K. J. Kwon-Chung et al.** (1995). Deletion of the *Candida glabrata* ERG3 and ERG11 genes: effect on cell viability, cell growth, sterol composition, and antifungal susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* 39(12): 2708-17.
- Geraghty, P. and K. Kavanagh** (2003). Disruption of mitochondrial function in *Candida albicans* leads to reduced cellular ergosterol levels and elevated growth in the presence of amphotericin B. *Arch Microbiol* 179(4): 295-300.
- Ghannoum, M. A. and L. B. Rice** (1999). Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin Microbiol Rev* 12(4): 501-17.
- Gillum, A. M., E. Y. Tsay and D. R. Kirsch** (1984). Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* ura3 and *E. coli* pyrF mutations. *Mol Gen Genet* 198(1): 179-82.

- Gomez-Lopez, A., A. Forastiero, E. Cendejas-Bueno, L. Gregson, E. Mellado, S. J. Howard et al.** (2014). An invertebrate model to evaluate virulence in *Aspergillus fumigatus*: The role of azole resistance. *Med Mycol*.
- Gomez-Lopez, A., O. Zaragoza, J. L. Rodriguez-Tudela and M. Cuenca-Estrella** (2008). Pharmacotherapy of yeast infections. *Expert Opin Pharmacother* 9(16): 2801-16.
- Gomez, B. L. and J. D. Nosanchuk** (2003). Melanin and fungi. *Curr Opin Infect Dis* 16(2): 91-6.
- Gray, K. C., D. S. Palacios, I. Dailey, M. M. Endo, B. E. Uno, B. C. Wilcock et al.** (2012). Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(7): 2234-9.
- Guinea, J., O. Zaragoza, P. Escribano, E. Martin-Mazuelos, J. Peman, F. Sanchez-Reus et al.** (2014). Molecular identification and antifungal susceptibility of yeast isolates causing fungemia collected in a population-based study in Spain in 2010 and 2011. *Antimicrob Agents Chemother* 58(3): 1529-37.
- Gustafson, K. S., G. M. Vercellotti, C. M. Bendel and M. K. Hostetter** (1991). Molecular mimicry in *Candida albicans*. Role of an integrin analogue in adhesion of the yeast to human endothelium. *J Clin Invest* 87(6): 1896-902.
- Hadrich, I., F. Makni, S. Neji, F. Cheikhrouhou, H. Bellaaj, M. Elloumi et al.** (2012). Amphotericin B in vitro resistance is associated with fatal *Aspergillus flavus* infection. *Med Mycol* 50(8): 829-34.
- Halliwell, S. C., M. C. Smith, P. Muston, S. L. Holland and S. V. Avery** (2012). Heterogeneous expression of the virulence-related adhesin Epa1 between individual cells and strains of the pathogen *Candida glabrata*. *Eukaryot Cell* 11(2): 141-50.
- Hapala, I., V. Klobucnikova, K. Mazanova and P. Kohut** (2005). Two mutants selectively resistant to polyenes reveal distinct mechanisms of antifungal activity by nystatin and amphotericin B. *Biochem Soc Trans* 33(Pt 5): 1206-9.
- Hartman, A. B., C. J. Powell, C. L. Schultz, E. V. Oaks and K. H. Eckels** (1991). Small-animal model to measure efficacy and immunogenicity of Shigella vaccine strains. *Infect Immun* 59(11): 4075-83.
- Hayakawa, M., E. E. Ghosn, M. da Gloria Teixeira de Sousa, K. S. Ferreira and S. R. Almeida** (2006). Phagocytosis, production of nitric oxide and pro-inflammatory cytokines by macrophages in the presence of dematiaceous [correction of dematiaceus] fungi that cause chromoblastomycosis. *Scand J Immunol* 64(4): 382-7.
- Helmerhorst, E. J., R. F. Troxler and F. G. Oppenheim** (2001). The human salivary peptide histatin 5 exerts its antifungal activity through the formation of reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(25): 14637-42.
- Hempel, S. L., G. R. Buettner, Y. Q. O'Malley, D. A. Wessels and D. M. Flaherty** (1999). Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. *Free Radic Biol Med* 27(1-2): 146-59.
- Herrero, E., J. Ros, G. Belli and E. Cabiscol** (2008). Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochim Biophys Acta* 1780(11): 1217-35.
- Hoehamer, C. F., E. D. Cummings, G. M. Hilliard and P. D. Rogers** (2010). Changes in the proteome of *Candida albicans* in response to azole, polyene, and echinocandin antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 54(5): 1655-64.
- Hoffmann, J. A.** (1995). Innate immunity of insects. *Curr Opin Immunol* 7(1): 4-10.

- Hope, W. W., E. Castagnola, A. H. Groll, E. Roilides, M. Akova, M. C. Arendrup et al.** (2012). ESCMID* guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012: prevention and management of invasive infections in neonates and children caused by Candida spp. Clin Microbiol Infect 18 Suppl 7: 38-52.
- Horn, D. L., D. Neofytos, E. J. Anaissie, J. A. Fishman, W. J. Steinbach, A. J. Olyaei et al.** (2009). Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. Clin Infect Dis 48(12): 1695-703.
- Hull, C. M., J. E. Parker, O. Bader, M. Weig, U. Gross, A. G. Warrilow et al.** (2012). Facultative sterol uptake in an ergosterol-deficient clinical isolate of *Candida glabrata* harboring a missense mutation in *ERG11* and exhibiting cross-resistance to azoles and amphotericin B. Antimicrob Agents Chemother 56(8): 4223-32.
- Imai, K., Y. Noda, H. Adachi and K. Yoda** (2005). A novel endoplasmic reticulum membrane protein Rcr1 regulates chitin deposition in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem 280(9): 8275-84.
- Imlay, J. A.** (2003). Pathways of oxidative damage. Annu Rev Microbiol 57: 395-418.
- Irazusta, V., A. Moreno-Cermeño, J. Ros and J. Tamarit** (2008). Estrategias proteómicas para el análisis de grupos carbonilo como marcadores de daño oxidativo en proteínas. Proteómica(2): 51-58.
- Ishida, N., Y. Aoyama, R. Hatanaka, Y. Oyama, S. Imajo, M. Ishiguro et al.** (1988). A single amino acid substitution converts cytochrome P450(14DM) to an inactive form, cytochrome P450SG1: complete primary structures deduced from cloned DNAs. Biochem Biophys Res Commun 155(1): 317-23.
- Jackson, J. C., L. A. Higgins and X. Lin** (2009). Conidiation color mutants of *Aspergillus fumigatus* are highly pathogenic to the heterologous insect host *Galleria mellonella*. PLoS One 4(1): e4224.
- Jacobsen, I. D., K. Grosse and B. Hube** (2012). Embryonated chicken eggs as alternative infection model for pathogenic fungi. Methods Mol Biol 845: 487-96.
- James, P. G., R. Cherniak, R. G. Jones, C. A. Stortz and E. Reiss** (1990). Cell-wall glucans of *Cryptococcus neoformans* Cap 67. Carbohydr Res 198(1): 23-38.
- Jamieson, D. J.** (1998). Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 14(16): 1511-27.
- Jiang, C., D. Dong, B. Yu, G. Cai, X. Wang, Y. Ji et al.** (2013). Mechanisms of azole resistance in 52 clinical isolates of *Candida tropicalis* in China. J Antimicrob Chemother 68(4): 778-85.
- Johnson, M. E., S. K. Katiyar and T. D. Edlind** (2011). New Fks hot spot for acquired echinocandin resistance in *Saccharomyces cerevisiae* and its contribution to intrinsic resistance of *Scedosporium* species. Antimicrob Agents Chemother 55(8): 3774-81.
- Joseph-Horne, T., D. W. Hollomon and P. M. Wood** (2001). Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. Biochim Biophys Acta 1504(2-3): 179-95.
- Joseph-Horne, T., R. S. Loeffler, D. W. Hollomon and S. L. Kelly** (1996). Amphotericin B resistant isolates of *Cryptococcus neoformans* without alteration in sterol biosynthesis. J Med Vet Mycol 34(3): 223-5.
- Katiyar, S., M. Pfaller and T. Edlind** (2006). *Candida albicans* and *Candida glabrata* clinical isolates exhibiting reduced echinocandin susceptibility. Antimicrob Agents Chemother 50(8): 2892-4.

- Kavanagh, K. and E. P. Reeves** (2004). Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev* 28(1): 101-12.
- Kelly, J. and K. Kavanagh** (2011). Caspofungin primes the immune response of the larvae of *Galleria mellonella* and induces a non-specific antimicrobial response. *J Med Microbiol* 60(Pt 2): 189-96.
- Kelly, S. L., D. C. Lamb, A. J. Corran, B. C. Baldwin and D. E. Kelly** (1995). Mode of action and resistance to azole antifungals associated with the formation of 14 alpha-methylergosta-8,24(28)-dien-3 beta,6 alpha-diol. *Biochem Biophys Res Commun* 207(3): 910-5.
- Kelly, S. L., D. C. Lamb and D. E. Kelly** (1999). Y132H substitution in *Candida albicans* sterol 14alpha-demethylase confers fluconazole resistance by preventing binding to haem. *FEMS Microbiol Lett* 180(2): 171-5.
- Kelly, S. L., D. C. Lamb, D. E. Kelly, N. J. Manning, J. Loeffler, H. Hebart et al.** (1997). Resistance to fluconazole and cross-resistance to amphotericin B in *Candida albicans* from AIDS patients caused by defective sterol delta5,6-desaturation. *FEBS Lett* 400(1): 80-2.
- Kelly, S. L., D. C. Lamb, J. Loeffler, H. Einsele and D. E. Kelly** (1999). The G464S amino acid substitution in *Candida albicans* sterol 14alpha-demethylase causes fluconazole resistance in the clinic through reduced affinity. *Biochem Biophys Res Commun* 262(1): 174-9.
- Kidd, S. E., F. Hagen, R. L. Tschärke, M. Huynh, K. H. Bartlett, M. Fyfe et al.** (2004). A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(49): 17258-63.
- Kobayashi, D., K. Kondo, N. Uehara, S. Otokoza, N. Tsuji, A. Yagihashi et al.** (2002). Endogenous reactive oxygen species is an important mediator of miconazole antifungal effect. *Antimicrob Agents Chemother* 46(10): 3113-7.
- Kollar, R., E. Petrakova, G. Ashwell, P. W. Robbins and E. Cabib** (1995). Architecture of the yeast cell wall. The linkage between chitin and beta(1-->3)-glucan. *J Biol Chem* 270(3): 1170-8.
- Kontoyiannis, D. P.** (2000). Modulation of fluconazole sensitivity by the interaction of mitochondria and erg3p in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Antimicrob Chemother* 46(2): 191-7.
- Kontoyiannis, D. P., R. E. Lewis, G. S. May, N. Osherov and M. G. Rinaldi** (2002). *Aspergillus nidulans* is frequently resistant to amphotericin B. *Mycoses* 45(9-10): 406-7.
- Krishnan, S., E. K. Manavathu and P. H. Chandrasekar** (2009). *Aspergillus flavus*: an emerging non-fumigatus Aspergillus species of significance. *Mycoses* 52(3): 206-22.
- Kucukates, E., Z. Erturan, S. Susever and Y. Yegenoglu** (2005). In vitro susceptibility of yeasts isolated from patients in intensive care units to fluconazole and amphotericin B during a 3-year period. *APMIS* 113(4): 278-83.
- Kwon-Chung, K.** (1976). Morphogenesis of *Filobasidiella neoformans*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia* 68(4): 821-33.
- Lamb, D. C., D. E. Kelly, W. H. Schunck, A. Z. Shyadehi, M. Akhtar, D. J. Lowe et al.** (1997). The mutation T315A in *Candida albicans* sterol 14alpha-demethylase causes reduced enzyme activity and fluconazole resistance through reduced affinity. *J Biol Chem* 272(9): 5682-8.
- Lamy-Freund, M. T., V. F. Ferreira and S. Schreier** (1985). Mechanism of inactivation of the polyene antibiotic amphotericin B. Evidence for radical formation in the process of autooxidation. *J Antibiot (Tokyo)* 38(6): 753-7.

- Lan, A., W. Xu, H. Zhang, X. Hua, D. Zheng, R. Guo et al.** (2013). Inhibition of ROS-activated p38MAPK pathway is involved in the protective effect of H₂S against chemical hypoxia-induced inflammation in PC12 cells. *Neurochem Res* 38(7): 1454-66.
- Laniado-Laborin, R. and M. N. Cabrales-Vargas** (2009). Amphotericin B: side effects and toxicity. *Rev Iberoam Micol* 26(4): 223-7.
- Lass-Flori, C., K. Griff, A. Mayr, A. Petzer, G. Gastl, H. Bonatti et al.** (2005). Epidemiology and outcome of infections due to *Aspergillus terreus*: 10-year single centre experience. *Br J Haematol* 131(2): 201-7.
- Lass-Flori, C., G. Kofler, G. Kropshofer, J. Hermans, A. Kreczy, M. P. Dierich et al.** (1998). In-vitro testing of susceptibility to amphotericin B is a reliable predictor of clinical outcome in invasive aspergillosis. *J Antimicrob Chemother* 42(4): 497-502.
- Latge, J. P.** (1999). *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 12(2): 310-50.
- Latge, J. P., I. Mouyna, F. Tekaia, A. Beauvais, J. P. Debeaupuis and W. Nierman** (2005). Specific molecular features in the organization and biosynthesis of the cell wall of *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol* 43 Suppl 1: S15-22.
- Leach, M. D., S. Budge, L. Walker, C. Munro, L. E. Cowen and A. J. Brown** (2012). Hsp90 orchestrates transcriptional regulation by Hsf1 and cell wall remodelling by MAPK signalling during thermal adaptation in a pathogenic yeast. *PLoS Pathog* 8(12): e1003069.
- Leroy, O., J. P. Gangneux, P. Montravers, J. P. Mira, F. Gouin, J. P. Sollet et al.** (2009). Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: a multicenter, prospective, observational study in France (2005-2006). *Crit Care Med* 37(5): 1612-8.
- Li, X., M. Gao, X. Han, S. Tao, D. Zheng, Y. Cheng et al.** (2012). Disruption of the phospholipase D gene attenuates the virulence of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* 80(1): 429-40.
- Linares, C. E., D. Griebeler, D. Cargnelutti, S. H. Alves, V. M. Morsch and M. R. Schetinger** (2006). Catalase activity in *Candida albicans* exposed to antineoplastic drugs. *J Med Microbiol* 55(Pt 3): 259-62.
- Lionakis, M. S.** (2011). *Drosophila* and *Galleria* insect model hosts: new tools for the study of fungal virulence, pharmacology and immunology. *Virulence* 2(6): 521-7.
- Lionakis, M. S. and D. P. Kontoyiannis** (2010). The growing promise of Toll-deficient *Drosophila melanogaster* as a model for studying *Aspergillus* pathogenesis and treatment. *Virulence* 1(6): 488-99.
- Lionakis, M. S. and D. P. Kontoyiannis** (2012). *Drosophila melanogaster* as a model organism for invasive aspergillosis. *Methods Mol Biol* 845: 455-68.
- Lipinski, T., X. Wu, J. Sadowska, E. Kreiter, Y. Yasui, S. Cheriaparambil et al.** (2012). A beta-mannan trisaccharide conjugate vaccine aids clearance of *Candida albicans* in immunocompromised rabbits. *Vaccine* 30(44): 6263-9.
- Liu, T. T., R. E. Lee, K. S. Barker, L. Wei, R. Homayouni and P. D. Rogers** (2005). Genome-wide expression profiling of the response to azole, polyene, echinocandin, and pyrimidine antifungal agents in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 49(6): 2226-36.
- Livermore, J. L., T. W. Felton, J. Abbott, A. Sharp, J. Goodwin, L. Gregson et al.** (2013). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of anidulafungin for experimental *Candida* endophthalmitis: insights into the utility of echinocandins for treatment of a potentially sight-threatening infection. *Antimicrob Agents Chemother* 57(1): 281-8.

- Lupetti, A., R. Danesi, M. Campa, M. Del Tacca and S. Kelly** (2002). Molecular basis of resistance to azole antifungals. *Trends Mol Med* 8(2): 76-81.
- Macedo-Márquez, A.** (2012). La producción de especies reactivas de oxígeno (EROS) en las mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae*. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 15(2): 97-103.
- Maertens, J., K. Theunissen, E. Verbeken, K. Lagrou, J. Verhaegen, M. Boogaerts et al.** (2004). Prospective clinical evaluation of lower cut-offs for galactomannan detection in adult neutropenic cancer patients and haematological stem cell transplant recipients. *Br J Haematol* 126(6): 852-60.
- Maesaki, S., P. Marichal, H. Vanden Bossche, D. Sanglard and S. Kohno** (1999). Rhodamine 6G efflux for the detection of CDR1-overexpressing azole-resistant strains. *J Antimicrob Chemother* 44(1): 27-31.
- Manavathu, E. K., S. Kallakuri, M. T. Arganoza and J. A. Vazquez** (1999). Amino acid variations of cytochrome P-450 lanosterol 14 alpha-demethylase (CYP51A1) from fluconazoleresistant clinical isolates of *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol* 16(4): 198-203.
- Martel, C. M., J. E. Parker, O. Bader, M. Weig, U. Gross, A. G. Warrilow et al.** (2010). A clinical isolate of *Candida albicans* with mutations in ERG11 (encoding sterol 14alpha-demethylase) and ERG5 (encoding C22 desaturase) is cross resistant to azoles and amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother* 54(9): 3578-83.
- Masia Canuto, M. and F. Gutierrez Rodero** (2002). Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. *Lancet Infect Dis* 2(9): 550-63.
- Mauch, R. M., O. Cunha Vde and A. L. Dias** (2013). The copper interference with the melanogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 55(2): 117-20.
- Mejanelle, L., J. F. Lopez, N. Gunde-Cimerman and J. O. Grimalt** (2001). Ergosterol biosynthesis in novel melanized fungi from hypersaline environments. *J Lipid Res* 42(3): 352-8.
- Mellado, E., L. Alcazar-Fuoli, M. Cuenca-Estrella and J. L. Rodriguez-Tudela** (2011). Role of *Aspergillus lentulus* 14-alpha sterol demethylase (Cyp51A) in azole drug susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* 55(12): 5459-68.
- Mellado, E., G. Garcia-Effron, L. Alcazar-Fuoli, M. Cuenca-Estrella and J. L. Rodriguez-Tudela** (2004). Substitutions at methionine 220 in the 14alpha-sterol demethylase (Cyp51A) of *Aspergillus fumigatus* are responsible for resistance in vitro to azole antifungal drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 48(7): 2747-50.
- Mellado, E., G. Garcia-Effron, L. Alcazar-Fuoli, W. J. Melchers, P. E. Verweij, M. Cuenca-Estrella et al.** (2007). A new *Aspergillus fumigatus* resistance mechanism conferring in vitro cross-resistance to azole antifungals involves a combination of cyp51A alterations. *Antimicrob Agents Chemother* 51(6): 1897-904.
- Mesa-Arango, A. C., L. Scorzoni and O. Zaragoza** (2012). It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. *Front Microbiol* 3: 286.
- Milani, G., W. Jarmuszkiewicz, C. M. Sluse-Goffart, A. Z. Schreiber, A. E. Vercesi and F. E. Sluse** (2001). Respiratory chain network in mitochondria of *Candida parapsilosis*: ADP/O appraisal of the multiple electron pathways. *FEBS Lett* 508(2): 231-5.
- Mitchell, P.** (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191: 144-8.

- Miyazaki, T., Y. Miyazaki, K. Izumikawa, H. Kakeya, S. Miyakoshi, J. E. Bennett et al.** (2006). Fluconazole treatment is effective against a *Candida albicans* erg3/erg3 mutant in vivo despite in vitro resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 50(2): 580-6.
- Montagna, M. T., G. Caggiano, G. Lovero, O. De Giglio, C. Coretti, T. Cuna et al.** (2013). Epidemiology of invasive fungal infections in the intensive care unit: results of a multicenter Italian survey (AURORA Project). *Infection* 41(3): 645-53.
- Montenegro, G., S. Sanchez Puch, V. M. Jewtuchowicz, M. V. Pinoni, S. Relloso, E. Temporitti et al.** (2009). Phenotypic and genotypic characterization of *Aspergillus lentulus* and *Aspergillus fumigatus* isolates in a patient with probable invasive aspergillosis. *J Med Microbiol* 58(Pt 3): 391-5.
- Morio, F., F. Pagniez, C. Lacroix, M. Miegerville and P. Le Pape** (2012). Amino acid substitutions in the *Candida albicans* sterol Delta5,6-desaturase (Erg3p) confer azole resistance: characterization of two novel mutants with impaired virulence. *J Antimicrob Chemother* 67(9): 2131-8.
- Morschhauser, J.** (2002). The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta* 1587(2-3): 240-8.
- Muhammed, M., J. J. Coleman, H. A. Carneiro and E. Mylonakis** (2011). The challenge of managing fusariosis. *Virulence* 2(2): 91-6.
- Muhammed, M., J. J. Coleman and E. Mylonakis** (2012). *Caenorhabditis elegans*: a nematode infection model for pathogenic fungi. *Methods Mol Biol* 845: 447-54.
- Mullins, J. G., J. E. Parker, H. J. Cools, R. C. Togawa, J. A. Lucas, B. A. Fraaije et al.** (2011). Molecular modelling of the emergence of azole resistance in *Mycosphaerella graminicola*. *PLoS One* 6(6): e20973.
- Munoz, P., M. Giannella, C. Fanciulli, J. Guinea, M. Valerio, L. Rojas et al.** (2011). *Candida tropicalis* fungaemia: incidence, risk factors and mortality in a general hospital. *Clin Microbiol Infect* 17(10): 1538-45.
- Mylonakis, E., R. Moreno, J. B. El Khoury, A. Idnurm, J. Heitman, S. B. Calderwood et al.** (2005). *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Infect Immun* 73(7): 3842-50.
- Natesan, S. K., A. K. Lamichchane, S. Swaminathan and W. Wu** (2013). Differential expression of ATP-binding cassette and/or major facilitator superfamily class efflux pumps contributes to voriconazole resistance in *Aspergillus flavus*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 76(4): 458-63.
- Nather, K. and C. A. Munro** (2008). Generating cell surface diversity in *Candida albicans* and other fungal pathogens. *FEMS Microbiol Lett* 285(2): 137-45.
- Navarro-Velasco, G. Y., R. C. Prados-Rosales, A. Ortiz-Urquiza, E. Quesada-Moraga and A. Di Pietro** (2011). *Galleria mellonella* as model host for the trans-kingdom pathogen *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genet Biol* 48(12): 1124-9.
- Negri, M., S. Silva, M. Henriques and R. Oliveira** (2012). Insights into *Candida tropicalis* nosocomial infections and virulence factors. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31(7): 1399-412.
- Nes, W. R., B. C. Sekula, W. D. Nes and J. H. Adler** (1978). The functional importance of structural features of ergosterol in yeast. *J Biol Chem* 253(17): 6218-25.
- Ngamskulrungroj, P., Y. Chang, J. Roh and K. J. Kwon-Chung** (2012). Differences in nitrogen metabolism between *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii*, the two etiologic agents of cryptococcosis. *PLoS One* 7(3): e34258.

- Noble, J. A., H. F. Tsai, S. D. Suffis, Q. Su, T. G. Myers and J. E. Bennett** (2013). STB5 is a negative regulator of azole resistance in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* 57(2): 959-67.
- Nolte, F. S., T. Parkinson, D. J. Falconer, S. Dix, J. Williams, C. Gilmore et al.** (1997). Isolation and characterization of fluconazole- and amphotericin B-resistant *Candida albicans* from blood of two patients with leukemia. *Antimicrob Agents Chemother* 41(1): 196-9.
- Nucci, M. and E. Anaissie** (2007). *Fusarium* infections in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev* 20(4): 695-704.
- Nucci, M., A. G. Varon, M. Garnica, T. Akiti, G. Barreiros, B. M. Trope et al.** (2013). Increased incidence of invasive fusariosis with cutaneous portal of entry, Brazil. *Emerg Infect Dis* 19(10): 1567-72.
- Nystrom, T.** (2005). Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO J* 24(7): 1311-7.
- Odds, F. C., A. J. Brown and N. A. Gow** (2003). Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol* 11(6): 272-9.
- Okawa, Y., M. Miyauchi and H. Kobayashi** (2008). Comparison of pathogenicity of various *Candida tropicalis* strains. *Biol Pharm Bull* 31(8): 1507-10.
- Oliver, B. G., P. M. Silver, C. Marie, S. J. Hoot, S. E. Leyde and T. C. White** (2008). Tetracycline alters drug susceptibility in *Candida albicans* and other pathogenic fungi. *Microbiology* 154(Pt 3): 960-70.
- Orozco, A. S., L. M. Higginbotham, C. A. Hitchcock, T. Parkinson, D. Falconer, A. S. Ibrahim et al.** (1998). Mechanism of fluconazole resistance in *Candida krusei*. *Antimicrob Agents Chemother* 42(10): 2645-9.
- Pachl, J., P. Svoboda, F. Jacobs, K. Vandewoude, B. van der Hoven, P. Spronk et al.** (2006). A randomized, blinded, multicenter trial of lipid-associated amphotericin B alone versus in combination with an antibody-based inhibitor of heat shock protein 90 in patients with invasive candidiasis. *Clin Infect Dis* 42(10): 1404-13.
- Palacios, D. S., T. M. Anderson and M. D. Burke** (2007). A post-PKS oxidation of the amphotericin B skeleton predicted to be critical for channel formation is not required for potent antifungal activity. *J Am Chem Soc* 129(45): 13804-5.
- Palacios, D. S., I. Dailey, D. M. Siebert, B. C. Wilcock and M. D. Burke** (2011). Synthesis-enabled functional group deletions reveal key underpinnings of amphotericin B ion channel and antifungal activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(17): 6733-8.
- Pan, S. C., S. M. Hsieh, S. C. Chang, H. T. Lee and Y. C. Chen** (2005). Septic *Candida krusei* thrombophlebitis of inferior vena cava with persistent fungemia successfully treated by new antifungal agents. *Med Mycol* 43(8): 731-4.
- Pappas, P. G., C. A. Kauffman, D. Andes, D. K. Benjamin, Jr., T. F. Calandra, J. E. Edwards, Jr. et al.** (2009). Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 48(5): 503-35.
- Pappas, P. G., C. M. Rotstein, R. F. Betts, M. Nucci, D. Talwar, J. J. De Waele et al.** (2007). Micafungin versus caspofungin for treatment of candidemia and other forms of invasive candidiasis. *Clin Infect Dis* 45(7): 883-93.
- Park, B. J., K. A. Wannemuehler, B. J. Marston, N. Govender, P. G. Pappas and T. M. Chiller** (2009). Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS* 23(4): 525-30.

- Park, H. G., I. S. Lee, Y. J. Chun, C. H. Yun, J. B. Johnston, P. R. Montellano et al.** (2011). Heterologous expression and characterization of the sterol 14alpha-demethylase CYP51F1 from *Candida albicans*. *Arch Biochem Biophys* 509(1): 9-15.
- Park, M., E. Do and W. H. Jung** (2013). Lipolytic enzymes involved in the virulence of human pathogenic fungi. *Mycobiology* 41(2): 67-72.
- Parmeland, L., M. Gazon, C. Guerin, L. Argaud, J. J. Lehot, O. Bastien et al.** (2013). *Candida albicans* and non-*Candida albicans* fungemia in an institutional hospital during a decade. *Med Mycol* 51(1): 33-7.
- Patel, P. K., J. E. Erlandsen, W. R. Kirkpatrick, D. K. Berg, S. D. Westbrook, C. Loudon et al.** (2012). The Changing Epidemiology of Oropharyngeal Candidiasis in Patients with HIV/AIDS in the Era of Antiretroviral Therapy. *AIDS Res Treat* 2012: 262471.
- Pelaez, T., P. Gijon, E. Bunsow, E. Bouza, W. Sanchez-Yebra, M. Valerio et al.** (2012). Resistance to voriconazole due to a G448S substitution in *Aspergillus fumigatus* in a patient with cerebral aspergillosis. *J Clin Microbiol* 50(7): 2531-4.
- Peleg, A. Y., S. Jara, D. Monga, G. M. Eliopoulos, R. C. Moellering, Jr. and E. Mylonakis** (2009). *Galleria mellonella* as a model system to study *Acinetobacter baumannii* pathogenesis and therapeutics. *Antimicrob Agents Chemother* 53(6): 2605-9.
- Peman, J., E. Canton, G. Quindos, E. Eraso, J. Alcoba, J. Guinea et al.** (2012). Epidemiology, species distribution and in vitro antifungal susceptibility of fungaemia in a Spanish multicentre prospective survey. *J Antimicrob Chemother* 67(5): 1181-7.
- Peman, J. and M. Salavert** (2012). [General epidemiology of invasive fungal disease]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 30(2): 90-8.
- Perea, S., J. L. Lopez-Ribot, W. R. Kirkpatrick, R. K. McAtee, R. A. Santillan, M. Martinez et al.** (2001). Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother* 45(10): 2676-84.
- Perfect, J. R.** (2013). Fungal diagnosis: how do we do it and can we do better? *Curr Med Res Opin* 29 Suppl 4: 3-11.
- Perfect, J. R., S. D. Lang and D. T. Durack** (1980). Chronic cryptococcal meningitis: a new experimental model in rabbits. *Am J Pathol* 101(1): 177-94.
- Perkhofer, S., C. Mrazek, L. Hartl and C. Lass-Flörl** (2010). In Vitro Susceptibility Testing in Fungi: What is its Role in Clinical Practice? *Curr Infect Dis Rep* 12(6): 401-8.
- Perlin, D. S.** (2007). Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. *Drug Resist Updat* 10(3): 121-30.
- Petrikkos, G. and A. Skiada** (2007). Recent advances in antifungal chemotherapy. *Int J Antimicrob Agents* 30(2): 108-17.
- Pfaller, M. A. and D. J. Diekema** (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 20(1): 133-63.
- Pfaller, M. A. and D. J. Diekema** (2010). Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Crit Rev Microbiol* 36(1): 1-53.
- Phillips, A. J., I. Sudbery and M. Ramsdale** (2003). Apoptosis induced by environmental stresses and amphotericin B in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(24): 14327-32.

- Pierce, C. G. and J. L. Lopez-Ribot** (2013). Candidiasis drug discovery and development: new approaches targeting virulence for discovering and identifying new drugs. *Expert Opin Drug Discov* 8(9): 1117-26.
- Pinjon, E., G. P. Moran, C. J. Jackson, S. L. Kelly, D. Sanglard, D. C. Coleman et al.** (2003). Molecular mechanisms of itraconazole resistance in *Candida dubliniensis*. *Antimicrob Agents Chemother* 47(8): 2424-37.
- Podust, L. M., T. L. Poulos and M. R. Waterman** (2001). Crystal structure of cytochrome P450 14alpha -sterol demethylase (CYP51) from *Mycobacterium tuberculosis* in complex with azole inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(6): 3068-73.
- Pradel, E. and J. J. Ewbank** (2004). Genetic models in pathogenesis. *Annu Rev Genet* 38: 347-63.
- Puig-Asensio, M., B. Padilla, J. Garnacho-Montero, O. Zaragoza, J. M. Aguado, R. Zaragoza et al.** (2014). Epidemiology and predictive factors for early and late mortality in *Candida* bloodstream infections: a population-based surveillance in Spain. *Clin Microbiol Infect* 20(4): O245-54.
- Purkait, B., A. Kumar, N. Nandi, A. H. Sardar, S. Das, S. Kumar et al.** (2012). Mechanism of amphotericin B resistance in clinical isolates of *Leishmania donovani*. *Antimicrob Agents Chemother* 56(2): 1031-41.
- Quinn, J. and A. Brown** (2007). *Candida: Comparative & Functional Genomics*. C. d. E. B. Hube. Norwich, UK, Caister Academic Press: 217-61. .
- Rajendran, R., E. Mowat, E. McCulloch, D. F. Lappin, B. Jones, S. Lang et al.** (2011). Azole resistance of *Aspergillus fumigatus* biofilms is partly associated with efflux pump activity. *Antimicrob Agents Chemother* 55(5): 2092-7.
- Ram, A. F. and F. M. Klis** (2006). Identification of fungal cell wall mutants using susceptibility assays based on Calcofluor white and Congo red. *Nat Protoc* 1(5): 2253-6.
- Ramanandraibe, E., M. Younsi, J. Coulon, V. Loppinet, A. Hakkou and R. Bonaly** (1998). Implication of cell wall constituents in the sensitivity of *Kluyveromyces lactis* strains to amphotericin B. *Res Microbiol* 149(2): 109-18.
- Rappleye, C. A. and W. E. Goldman** (2006). Defining virulence genes in the dimorphic fungi. *Annu Rev Microbiol* 60: 281-303.
- Reboli, A. C., C. Rotstein, P. G. Pappas, S. W. Chapman, D. H. Kett, D. Kumar et al.** (2007). Anidulafungin versus fluconazole for invasive candidiasis. *N Engl J Med* 356(24): 2472-82.
- Rex, J. H., C. R. Cooper, Jr., W. G. Merz, J. N. Galgiani and E. J. Anaissie** (1995). Detection of amphotericin B-resistant *Candida* isolates in a broth-based system. *Antimicrob Agents Chemother* 39(4): 906-9.
- Richardson, M. and C. Lass-Flörl** (2008). Changing epidemiology of systemic fungal infections. *Clin Microbiol Infect* 14 Suppl 4: 5-24.
- Robert, V. A. and A. Casadevall** (2009). Vertebrate endothermy restricts most fungi as potential pathogens. *J Infect Dis* 200(10): 1623-6.
- Rodero, L., E. Mellado, A. C. Rodriguez, A. Salve, L. Guelfand, P. Cahn et al.** (2003). G484S amino acid substitution in lanosterol 14-alpha demethylase (ERG11) is related to fluconazole resistance in a recurrent *Cryptococcus neoformans* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 47(11): 3653-6.

- Rodriguez-Creixems, M., L. Alcala, P. Munoz, E. Cercenado, T. Vicente and E. Bouza** (2008). Bloodstream infections: evolution and trends in the microbiology workload, incidence, and etiology, 1985-2006. *Medicine (Baltimore)* 87(4): 234-49.
- Rogers, T. R.** (2008). Treatment of zygomycosis: current and new options. *J Antimicrob Chemother* 61 Suppl 1: i35-40.
- Roman, E., D. M. Arana, C. Nombela, R. Alonso-Monge and J. Pla** (2007). MAP kinase pathways as regulators of fungal virulence. *Trends Microbiol* 15(4): 181-90.
- Romani, L., F. Bistoni and P. Puccetti** (2003). Adaptation of *Candida albicans* to the host environment: the role of morphogenesis in virulence and survival in mammalian hosts. *Curr Opin Microbiol* 6(4): 338-43.
- Rowan, R., C. Moran, M. McCann and K. Kavanagh** (2009). Use of *Galleria mellonella* larvae to evaluate the in vivo anti-fungal activity of [Ag2(mal)(phen)3]. *Biometals* 22(3): 461-7.
- Rudek, W.** (1978). Esterase activity in *Candida* species. *J Clin Microbiol* 8(6): 756-9.
- Rueda, C., M. Cuenca-Estrella and O. Zaragoza** (2014). Paradoxical growth of *Candida albicans* in the presence of caspofungin is associated with multiple cell wall rearrangements and decreased virulence. *Antimicrob Agents Chemother* 58(2): 1071-83.
- Ruping, M. J., S. Gerlach, G. Fischer, C. Lass-Flörl, M. Hellmich, J. J. Vehreschild et al.** (2011). Environmental and clinical epidemiology of *Aspergillus terreus*: data from a prospective surveillance study. *J Hosp Infect* 78(3): 226-30.
- Ruy, F., A. E. Vercesi and A. J. Kowaltowski** (2006). Inhibition of specific electron transport pathways leads to oxidative stress and decreased *Candida albicans* proliferation. *J Bioenerg Biomembr* 38(2): 129-35.
- Saag, M. S., R. J. Graybill, R. A. Larsen, P. G. Pappas, J. R. Perfect, W. G. Powderly et al.** (2000). Practice guidelines for the management of cryptococcal disease. Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 30(4): 710-8.
- Salzet, M.** (2001). Vertebrate innate immunity resembles a mosaic of invertebrate immune responses. *Trends Immunol* 22(6): 285-8.
- Samaranayake, Y. H. and L. P. Samaranayake** (1994). *Candida krusei*: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen. *J Med Microbiol* 41(5): 295-310.
- Sangalli-Leite, F., L. Scorzoni, A. C. Mesa-Arango, C. Casas, E. Herrero, M. J. Gianinni et al.** (2011). Amphotericin B mediates killing in *Cryptococcus neoformans* through the induction of a strong oxidative burst. *Microbes Infect* 13(5): 457-67.
- Sanglard, D. and J. Bille** (2002). Current understanding of the modes of action of and resistance mechanism to conventional and emerging antifungal agents for treatment of *Candida* infections. *Candida and Candidiasis*. R. A. Calderone. Washinton, DC, American Society of Microbiology: 349-83.
- Sanglard, D., F. Ischer, T. Parkinson, D. Falconer and J. Bille** (2003). *Candida albicans* mutations in the ergosterol biosynthetic pathway and resistance to several antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 47(8): 2404-12.
- Sanglard, D., K. Kuchler, F. Ischer, J. L. Pagani, M. Monod and J. Bille** (1995). Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. *Antimicrob Agents Chemother* 39(11): 2378-86.
- Sanglard, D. and F. C. Odds** (2002). Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis* 2(2): 73-85.

- Sarinova, M., V. Strakova, K. Balkova and Y. Gbelska** (2007). Decreased susceptibility to antifungals in respiratory-deficient *Kluyveromyces lactis* mutants. *Folia Microbiol (Praha)* 52(5): 484-90.
- Scorzoni, L., M. P. de Lucas, A. C. Mesa-Arango, A. M. Fusco-Almeida, E. Lozano, M. Cuenca-Estrella et al.** (2013). Antifungal efficacy during *Candida krusei* infection in non-conventional models correlates with the yeast in vitro susceptibility profile. *PLoS One* 8(3): e60047.
- Seider, K., A. Heyken, A. Luttich, P. Miramon and B. Hube** (2010). Interaction of pathogenic yeasts with phagocytes: survival, persistence and escape. *Curr Opin Microbiol* 13(4): 392-400.
- Semighini, C. P., M. Marins, M. H. Goldman and G. H. Goldman** (2002). Quantitative analysis of the relative transcript levels of ABC transporter Atr genes in *Aspergillus nidulans* by real-time reverse transcription-PCR assay. *Appl Environ Microbiol* 68(3): 1351-7.
- Sena, L. A. and N. S. Chandel** (2012). Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell* 48(2): 158-67.
- Seo, K., H. Akiyoshi and Y. Ohnishi** (1999). Alteration of cell wall composition leads to amphotericin B resistance in *Aspergillus flavus*. *Microbiol Immunol* 43(11): 1017-25.
- Shapiro, R. S. and L. E. Cowen** (2012). Uncovering cellular circuitry controlling temperature-dependent fungal morphogenesis. *Virulence* 3(4): 400-4.
- Shimamura, T., N. Kubota, S. Nagasaka, T. Suzuki, H. Mukai and K. Shibuya** (2011). Establishment of a novel model of onychomycosis in rabbits for evaluation of antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 55(7): 3150-5.
- Sionov, E., Y. C. Chang, H. M. Garraffo, M. A. Dolan, M. A. Ghannoum and K. J. Kwon-Chung** (2012). Identification of a *Cryptococcus neoformans* cytochrome P450 lanosterol 14 α -demethylase (Erg11) residue critical for differential susceptibility between fluconazole/voriconazole and itraconazole/posaconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 56(3): 1162-9.
- Sobel, J. D.** (2007). Vulvovaginal candidosis. *Lancet* 369(9577): 1961-71.
- Sokol-Anderson, M., J. E. Sligh, Jr., S. Elberg, J. Brajtburg, G. S. Kobayashi and G. Medoff** (1988). Role of cell defense against oxidative damage in the resistance of *Candida albicans* to the killing effect of amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother* 32(5): 702-5.
- Sokol-Anderson, M. L., J. Brajtburg and G. Medoff** (1986). Amphotericin B-induced oxidative damage and killing of *Candida albicans*. *J Infect Dis* 154(1): 76-83.
- Spellberg, B., Marr K and F. SG** (2012). *Candida and Candidiasis*. C. C. Calderone RA. Washington, DC., ASM Press: 225-42.
- Staab, J. F., S. D. Bradway, P. L. Fidel and P. Sundstrom** (1999). Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. *Science* 283(5407): 1535-8.
- Staab, J. F., J. N. Kahn and K. A. Marr** (2010). Differential *Aspergillus lentulus* echinocandin susceptibilities are Fksp independent. *Antimicrob Agents Chemother* 54(12): 4992-8.
- Stefanatos, R. and A. Sanz** (2011). Mitochondrial complex I: a central regulator of the aging process. *Cell Cycle* 10(10): 1528-32.
- Sugar, A. M., C. A. Hitchcock, P. F. Troke and M. Picard** (1995). Combination therapy of murine invasive candidiasis with fluconazole and amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother* 39(3): 598-601.
- Sun, J. and D. Liu** (2003). Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. *Journal of Plankton Research* Volume 25 (Number 11): 1331-46.

- Sun, X., R. Ruan, L. Lin, C. Zhu, T. Zhang, M. Wang *et al.* (2013). Genomewide investigation into DNA elements and ABC transporters involved in imazalil resistance in *Penicillium digitatum*. FEMS Microbiol Lett 348(1): 11-8.
- Symoens, F., G. Haase, M. Pihet, J. Carrere, H. Beguin, N. Degand *et al.* (2010). Unusual *Aspergillus* species in patients with cystic fibrosis. Med Mycol 48 Suppl 1: S10-6.
- Tampakakis, E., I. Okoli and E. Mylonakis (2008). A *C. elegans*-based, whole animal, in vivo screen for the identification of antifungal compounds. Nat Protoc 3(12): 1925-31.
- te Welscher, Y. M., L. Jones, M. R. van Leeuwen, J. Dijksterhuis, B. de Kruijff, G. Eitzen *et al.* (2010). Natamycin inhibits vacuole fusion at the priming phase via a specific interaction with ergosterol. Antimicrob Agents Chemother 54(6): 2618-25.
- Temple, M. D., G. G. Perrone and I. W. Dawes (2005). Complex cellular responses to reactive oxygen species. Trends Cell Biol 15(6): 319-26.
- Thomas, R. J., K. A. Hamblin, S. J. Armstrong, C. M. Muller, M. Bokori-Brown, S. Goldman *et al.* (2013). *Galleria mellonella* as a model system to test the pharmacokinetics and efficacy of antibiotics against *Burkholderia pseudomallei*. Int J Antimicrob Agents 41(4): 330-6.
- Thomaz, L., R. Garcia-Rodas, A. J. Guimaraes, C. P. Taborda, O. Zaragoza and J. D. Nosanchuk (2013). *Galleria mellonella* as a model host to study *Paracoccidioides lutzii* and *Histoplasma capsulatum*. Virulence 4(2): 139-46.
- Tojo, S., F. Naganuma, K. Arakawa and S. Yokoo (2000). Involvement of both granular cells and plasmatocytes in phagocytic reactions in the greater wax moth, *Galleria mellonella*. J Insect Physiol 46(7): 1129-35.
- Torelli, R., B. Posteraro, S. Ferrari, M. La Sorda, G. Fadda, D. Sanglard *et al.* (2008). The ATP-binding cassette transporter-encoding gene CgSNQ2 is contributing to the CgPDR1-dependent azole resistance of *Candida glabrata*. Mol Microbiol 68(1): 186-201.
- Tortorano, A. M., A. Prigitano, G. Dho, A. Grancini and M. Passera (2012). Antifungal susceptibility profiles of *Candida* isolates from a prospective survey of invasive fungal infections in Italian intensive care units. J Med Microbiol 61(Pt 3): 389-93.
- Trejo, W. H. and R. E. Bennett (1963). Streptomyces nodosus sp. n., the amphotericin-producing organism. J Bacteriol 85: 436-9.
- Tucker, S. C. and A. Casadevall (2002). Replication of *Cryptococcus neoformans* in macrophages is accompanied by phagosomal permeabilization and accumulation of vesicles containing polysaccharide in the cytoplasm. Proc Natl Acad Sci U S A 99(5): 3165-70.
- Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. J Physiol 552(Pt 2): 335-44.
- Ullmann, A. J., M. Akova, R. Herbrecht, C. Viscoli, M. C. Arendrup, S. Arikan-Akdagli *et al.* (2012). ESCMID* guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012: adults with haematological malignancies and after haematopoietic stem cell transplantation (HCT). Clin Microbiol Infect 18 Suppl 7: 53-67.
- van de Sande, W. W., R. A. Mathot, M. T. ten Kate, W. van Vianen, M. Tavakol, B. J. Rijnders *et al.* (2009). Combination therapy of advanced invasive pulmonary aspergillosis in transiently neutropenic rats using human pharmacokinetic equivalent doses of voriconazole and anidulafungin. Antimicrob Agents Chemother 53(5): 2005-13.
- Vandeputte, P., G. Larcher, T. Berges, G. Renier, D. Chabasse and J. P. Bouchara (2005). Mechanisms of azole resistance in a clinical isolate of *Candida tropicalis*. Antimicrob Agents Chemother 49(11): 4608-15.

- Vandeputte, P., G. Tronchin, T. Berges, C. Hennequin, D. Chabasse and J. P. Bouchara** (2007). Reduced susceptibility to polyenes associated with a missense mutation in the ERG6 gene in a clinical isolate of *Candida glabrata* with pseudohyphal growth. *Antimicrob Agents Chemother* 51(3): 982-90.
- Vermitsky, J. P. and T. D. Edlind** (2004). Azole resistance in *Candida glabrata*: coordinate upregulation of multidrug transporters and evidence for a Pdr1-like transcription factor. *Antimicrob Agents Chemother* 48(10): 3773-81.
- Vincent, B. M., A. K. Lancaster, R. Scherz-Shouval, L. Whitesell and S. Lindquist** (2013). Fitness trade-offs restrict the evolution of resistance to amphotericin B. *PLoS Biol* 11(10): e1001692.
- Volmer, A. A., A. M. Szpilman and E. M. Carreira** (2010). Synthesis and biological evaluation of amphotericin B derivatives. *Nat Prod Rep* 27(9): 1329-49.
- Walker, L. A., N. A. Gow and C. A. Munro** (2013). Elevated chitin content reduces the susceptibility of *Candida* species to caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother* 57(1): 146-54.
- Walsh, T. J., V. Petraitis, R. Petraitiene, A. Field-Ridley, D. Sutton, M. Ghannoum et al.** (2003). Experimental pulmonary aspergillosis due to *Aspergillus terreus*: pathogenesis and treatment of an emerging fungal pathogen resistant to amphotericin B. *J Infect Dis* 188(2): 305-19.
- Waness, A., G. A. Dawsari and H. Al Jahdali** (2009). The rise of an opportunistic infection called "Invasive Zygomycosis". *J Glob Infect Dis* 1(2): 131-8.
- Warn, P. A., J. Morrissey, C. B. Moore and D. W. Denning** (2000). In vivo activity of amphotericin B lipid complex in immunocompromised mice against fluconazole-resistant or fluconazole-susceptible *Candida tropicalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 44(10): 2664-71.
- Warn, P. A., A. Sharp, G. Morrissey and D. W. Denning** (2002). In vivo activity of micafungin in a persistently neutropenic murine model of disseminated infection caused by *Candida tropicalis*. *J Antimicrob Chemother* 50(6): 1071-4.
- Warrilow, A. G., J. G. Mullins, C. M. Hull, J. E. Parker, D. C. Lamb, D. E. Kelly et al.** (2012). S279 point mutations in *Candida albicans* Sterol 14-alpha demethylase (CYP51) reduce in vitro inhibition by fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 56(4): 2099-107.
- Watson, P. F., M. E. Rose, S. W. Ellis, H. England and S. L. Kelly** (1989). Defective sterol C5-6 desaturation and azole resistance: a new hypothesis for the mode of action of azole antifungals. *Biochem Biophys Res Commun* 164(3): 1170-5.
- White, T., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor.** (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: A guide to methods and applications. . J. S. D. H. Gelfand, T. J. White, and M. A. Innis. San Diego, CA, Academic Press: 315–22.
- White, T. C., K. A. Marr and R. A. Bowden** (1998). Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 11(2): 382-402.
- Wisplinghoff, H., T. Bischoff, S. M. Tallent, H. Seifert, R. P. Wenzel and M. B. Edmond** (2004). Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 39(3): 309-17.
- Wriessnegger, T., E. Leitner, M. R. Beleggratis, E. Ingolic and G. Daum** (2009). Lipid analysis of mitochondrial membranes from the yeast *Pichia pastoris*. *Biochim Biophys Acta* 1791(3): 166-72.
- Xiao, L., V. Madison, A. S. Chau, D. Loebenberg, R. E. Palermo and P. M. McNicholas** (2004). Three-dimensional models of wild-type and mutated forms of cytochrome P450 14alpha-sterol demethylases from *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* provide insights into posaconazole binding. *Antimicrob Agents Chemother* 48(2): 568-74.

Yakes, F. M. and B. Van Houten (1997). Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(2): 514-9.

Zaragoza, O., C. J. Chrisman, M. V. Castelli, S. Frases, M. Cuenca-Estrella, J. L. Rodriguez-Tudela et al. (2008). Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival. *Cell Microbiol* 10(10): 2043-57.

ANEXOS

8. ANEXOS

8.1. Secuencias de los genes *ERG3* y *ERG11*

ERG11 Candida tropicalis ATCC 750. GenBank: KC542323

Candida tropicalis strain ATCC 750 cytochrome P450 lanosterol 14- α -demethylase gene, complete cds

```

LOCUS      KC542323                1587 bp    DNA        linear    PLN 23-SEP-2013
DEFINITION Candida tropicalis strain ATCC 750 cytochrome P450 lanosterol
            14- $\alpha$ -demethylase gene, complete cds.
ACCESSION  KC542323
VERSION    KC542323.1  GI:532528567
SOURCE     Candida tropicalis
ORGANISM   Candida tropicalis
            Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Saccharomycotina;
            Saccharomycetes; Saccharomycetales; mitosporic Saccharomycetales;
            Candida.
REFERENCE  1 (bases 1 to 1587)
AUTHORS    Forastiero,A., Mesa-Arango,A.C., Alastruey-Izquierdo,A.,
            Alcazar-Fuoli,L., Bernal-Martinez,L., Pelaez,T., Lopez,J.F.,
            Grimalt,J.O., Gomez-Lopez,A., Cuesta,I., Zaragoza,O. and Mellado,E.
TITLE      Candida tropicalis Antifungal Cross-Resistance Is Related to
            Different Azole Target (Erg11p) Modifications
JOURNAL    Antimicrob. Agents Chemother. 57 (10), 4769-4781 (2013)
PUBMED     23877676
REFERENCE  2 (bases 1 to 1587)
AUTHORS    Alastruey-Izquierdo,A., Forastiero,A. and Mesa-Arango,A.
TITLE      Direct Submission
JOURNAL    Submitted (25-JAN-2013) Mycology Reference Laboratory, Spanish
            National Centre for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III,
            Carretera de Majadahonda a Pozuelo Km.2, Majadahonda, Madrid 28220,
            Spain
COMMENT    ##Assembly-Data-START##
            Assembly Method      :: SeqMan Pro v. 8.0.2
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source            1..1587
                        /organism="Candida tropicalis"
                        /mol_type="genomic DNA"
                        /strain="ATCC 750"
                        /culture_collection="ATCC:750"
                        /db_xref="taxon:5482"
     mRNA              <1..>1587
                        /product="cytochrome P450 lanosterol 14- $\alpha$ -demethylase"
     CDS               1..1587
                        /codon_start=1
                        /transl_table=12
                        /product="cytochrome P450 lanosterol 14- $\alpha$ -demethylase"
                        /protein_id="AGT98513.1"
                        /db_xref="GI:532528568"
                        /translation="MAIVDTAIDGINYFLSLSLTQQITILVVFPFIYNIAWQLLYSLR
KDRVPMVFYWPWFSGAASYGMQPYEFFEKRLKYGDVFSFMLLGKVMFTVYLGPKGHE
FIYNAKLSDVSAEEAYTHLTTPVFGKGVYDCPNRLMEQKKFAKFALTDSFKTYVP

```

KIREEVLYNFVNDVSFKTKERDHGVASVMKTQPEITIFTASRCLFGDEMRSFDRSFA
 QLYADLDKGFTPIINFVFPNLPLPHYWRRDAAQRKISAHYMKIEKRRRESGDIDPKRDL
 IDSLVNSTYKDGVMKTDQEIANLLIGVLMGGQHTSASTSAWFLHLAEQPQLQDDLY
 EELTNLLKEKGGDLNDLTYEDLQKLPLVNNTIKETLRMHMPLHSIFRKVMNPLRVPNT
 KYVIPKGHYVLVSAGYAHTSDRWFEHPEHFNPRRWESDDTKASAVSFNSEDVVDYGF
 KISKGVSSPYLPFGGGRHRCIGEQFAYVQLGTILTTIYNFKWRLNGDKVPDQSM
 VTLPLEPAEIVWEKRDTCMV"

ORIGIN

```

1 atggctattg ttgatactgc cattgatggc atcaattatt tcttatcctt atcattaact
61 caacaaatca ccatcttggt tgttttccca ttcacttaca acatagcatg gcaattactt
121 tactccttaa gaaaagatag agttccaatg gttttctact ggatcccatg gtttggttct
181 gctgctagtt atggtagtga accatacgaa ttccttgaaa agtgtagatt gaaatatggt
241 gatgtttttt catttatggt attgggtaaa gttatgactg tttatttggg tccaaaagggt
301 cacgaattca ttacaaatgc taaattatcc gatgtttctg ctgaagaagc ttatacccat
361 ttgactactc ctgtttttgg taaagggtgt atttatgatt gtccaaactc tagattaatg
421 gaacaaaaga agtttgctaa atttgctttg actactgatt ctttcaaac ctatgttcca
481 aagatcagag aagaagtttt gaattatttt gttaacgatg ttagtttcaa aaccaaggaa
541 agagaccatg gtgttgctag tgttatgaaa actcaaccag aaatcactat tttcactgct
601 tctcgttggt tatttggtga tgaaatgaga aagagtttcg acagatcatt tgctcaattg
661 tatgctgact tggataaagg tttcacccca atcaactttg ttttcccaa cttgccatta
721 cctcattact ggagacgtga cgctgctcaa agaaagatat ctgctcatta catgaaggaa
781 attaaagaaa gaagagaaag cgggtgatatt gatccaaaga gagatttgat tgattccttg
841 ttggttaact ctacttataa agatggtggt aaaatgactg atcaagaaat tgctaaccctt
901 ttaattggtg ttttgatggg tggtaacat acttctgctt ccacttctgc ctggttcttg
961 ttgcatttgg ctgaacaacc acaattacaa gatgatcttt acgaagaatt gaccaacttg
1021 ttgaaagaaa aggggtggtga cttgaacgat ttgacttacg aagacttgca aaaattacca
1081 ttggttaaca acactattaa agaaactttg agaatgcaca tgccattgca ttctattttc
1141 agaaaagtta tgaaccatt gagagtcca aataccaaat atgttattcc aaaaggtcac
1201 tatgtcttag tttctgccgg ttatgctcat accagtgata gatggttga acaccagaa
1261 catttcaacc caagaagatg ggaatctgat gataccaagg ctagtgtgtt ttctttcaat
1321 tctgaagata ctgttgatta tggtttcggt aaaatttcca aggggtgtct ctctccatac
1381 ttgccattcg gtggtggtag acacagatgt attggtgaac aatttgctta tgttcaattg
1441 ggaactatth tgaccactta tatctacaac ttcaaatgga gattaaacg tgataagggt
1501 ccagatgttg attaccaatc catggttacc ttaccattag aacctgctga aattgtttgg
1561 gaaaagagag atacttgtat ggtttag

```

ERG11 *Candida tropicalis* ATCC 200956. GenBank: KC542324

Candida tropicalis strain ATCC 200956 cytochrome P450 lanosterol 14-alpha-demethylase gene, complete cds

LOCUS KC542324 1455 bp DNA linear PLN 23-SEP-2013
 DEFINITION *Candida tropicalis* strain ATCC 200956 cytochrome P450 lanosterol 14-alpha-demethylase gene, complete cds.
 ACCESSION KC542324
 VERSION KC542324.1 GI:532528569
 SOURCE *Candida tropicalis*
 ORGANISM *Candida tropicalis*
 Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Saccharomycotina; Saccharomycetes; Saccharomycetales; mitosporic Saccharomycetales; *Candida*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1455)
 AUTHORS Forastiero,A., Mesa-Arango,A.C., Alastruey-Izquierdo,A., Alcazar-Fuoli,L., Bernal-Martinez,L., Pelaez,T., Lopez,J.F., Grimalt,J.O., Gomez-Lopez,A., Cuesta,I., Zaragoza,O. and Mellado,E.
 TITLE *Candida tropicalis* Antifungal Cross-Resistance Is Related to Different Azole Target (Erg11p) Modifications
 JOURNAL Antimicrob. Agents Chemother. 57 (10), 4769-4781 (2013)
 PUBMED [23877676](#)
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1455)
 AUTHORS Alastruey-Izquierdo,A., Forastiero,A. and Mesa-Arango,A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (25-JAN-2013) Mycology Reference Laboratory, Spanish National Centre for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Carretera de Majadahonda a Pozuelo Km.2, Majadahonda, Madrid 28220, Spain
 COMMENT ##Assembly-Data-START##
 Assembly Method :: SeqMan Pro v. 8.0.2
 Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
 ##Assembly-Data-END##
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..1455
 /organism="Candida tropicalis"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="ATCC 200956"
 /culture_collection="ATCC:[200956](#)"
 /db_xref="taxon:[5482](#)"
 mRNA <1..>1455
 /product="cytochrome P450 lanosterol 14-alpha-demethylase"
 CDS 1..1455
 /codon_start=1
 /transl_table=[12](#)
 /product="cytochrome P450 lanosterol 14-alpha-demethylase"
 /protein_id="[AGT98514.1](#)"
 /db_xref="GI:532528570"
 /translation="MAIVDTAIDGINYFLSLSLTQQITILVVFPPFIYNIAWQLLYSLR
 KDRVPMVFYWIPIWFGSAASYGMQPYEFFEKCRLKYGDVFSFMLLGKVMPTVYLGPKGHE
 FIYNAKLSDVSAEEAYTHLTTPVFGKGVYDCPNRLMEQKKFAKFALTDSFKTYVP
 KIREEVNLNYFVNDVSFKTKERDHGVASVMKTQPEITIFTASRCLFGDEMRKSFDRSFA
 QLYADLDKGFPTINFVFPNPLPHYWRRDAAQRKISAHYMKIEIKRRRESGDIDPKRVL

LHLAEQPLQDDLYEELTNLLKEKGGDLNDLTYEDLQKLPLVNNNTIKETLRMHMPLHS
IFRKVMNPLRVPNTKYVIPKGHYVLVSAGYAHTSDRWFEHPEHFNPRRWESDDTKASA
VSFNSEDTVDYGFVKISKGVSSPYLPFGGGRHRCIGEQFAYVQLGTILTYYIYNFKWR
LNGDKVPDVDYQSMVTLALEPAEIVWEKRDTCMV"

ORIGIN

```
1 atggctattg ttgatactgc cattgatggc atcaattatt tcttatcctt atcattaact
61 caacaaatca ccatcttggt tgttttccca ttcactctaca acatagcatg gcaattactt
121 tactccttaa gaaaagatag agttccaatg gttttctact ggatcccatg gtttggttct
181 gctgctagtt atggtagtga accatacgaa ttctttgaaa agtgtagatt gaaatatggt
241 gatgtttttt cttttatggt attgggtaaa gttatgactg tttatttggg tccaaaagggt
301 cacgaattca tttacaatgc taaattatcc gatgtttctg ctgaagaagc ttatacccat
361 ttgactactc ctgtttttgg taaagggtgt atttatgatt gtccaaactc tagattaatg
421 gaacaaaaga agtttgctaa atttgctttg actactgatt ctttcaaaac ctatgttcca
481 aagatcagag aagaagtttt gaattatttt gttaacgatg ttagtttcaa aaccaaggaa
541 agagaccatg gtgttgctag tgttatgaaa actcaaccag aaatcactat tttcactgct
601 tctcggtgtt tatttggtga tgaaatgaga aagagtttcg acagatcatt tgctcaattg
661 tatgctgact tggataaagg tttcacccca atcaactttg ttttccaaa cttgccatta
721 cctcattact ggagacgtga cgctgctcaa agaaagatat ctgctcatta catgaaggaa
781 attaagagaa gaagagaaag cggtgatatt gatccaaaga gagtcttggt gcatttggct
841 gaacaaccac aattacaaga tgatctttac gaagaattga ccaacttggt gaaagaaaag
901 ggtggtgact tgaacgattt gacttacgaa gacttgcaaa aattaccatt gggttaacaac
961 actattaag aaactttgag aatgcacatg ccattgcatt ctattttcag aaaagttatg
1021 aaccattga gagtcccaa taccaaatat gttattccaa aaggtcacta tgtcttagtt
1081 tctgccggtt atgctcatac cagtgataga tgggttgaac acccagaaca tttcaaccca
1141 agaagatggg aatctgatga taccaaggct agtgctgttt ctttcaattc tgaagatact
1201 gttgattatg gtttcggtaa aatttccaaa ggtgtctcct ctccatactt gccattcggg
1261 ggtggtagac acagatgtat tggatgaaca tttgcttatg ttcaattggg aactattttg
1321 accacttata tctacaactt caaatggaga ttaaacgggtg ataaggttcc agatgttgat
1381 taccaatcca tgggttacctt agcattagaa cctgctgaaa tcgtttggga aaagagagat
1441 acttgtagtg ttttag
```

ERG11 *Candida tropicalis* CNM-CM 6835 GenBank KC542325

Candida tropicalis strain CNM-CM:6835 cytochrome P450 lanosterol 14-alpha-demethylase gene, complete cds

LOCUS KC542325 1587 bp DNA linear PLN 23-SEP-2013

DEFINITION *Candida tropicalis* strain CNM-CM:6835 cytochrome P450 lanosterol 14-alpha-demethylase gene, complete cds.

ACCESSION KC542325

VERSION KC542325.1 GI:532528571

SOURCE *Candida tropicalis*

ORGANISM *Candida tropicalis*

Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Saccharomycotina;
Saccharomycetes; Saccharomycetales; mitosporic Saccharomycetales;
Candida.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1587)

AUTHORS Forastiero,A., Mesa-Arango,A.C., Alastruey-Izquierdo,A.,
Alcazar-Fuoli,L., Bernal-Martinez,L., Pelaez,T., Lopez,J.F.,
Grimalt,J.O., Gomez-Lopez,A., Cuesta,I., Zaragoza,O. and Mellado,E.

TITLE *Candida tropicalis* Antifungal Cross-Resistance Is Related to
Different Azole Target (Erg11p) Modifications

JOURNAL Antimicrob. Agents Chemother. 57 (10), 4769-4781 (2013)

PUBMED 23877676

REFERENCE 2 (bases 1 to 1587)

AUTHORS Alastruey-Izquierdo,A., Forastiero,A. and Mesa-Arango,A.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (25-JAN-2013) Mycology Reference Laboratory, Spanish
National Centre for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III,
Carretera de Majadahonda a Pozuelo Km.2, Majadahonda, Madrid 28220,
Spain

COMMENT ##Assembly-Data-START##

Assembly Method :: SeqMan Pro v. 8.0.2

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1587

/organism="Candida tropicalis"

/mol_type="genomic DNA"

/strain="CNM-CM:6835"

/db_xref="taxon:5482"

/country="India"

mRNA <1..>1587

/product="cytochrome P450 lanosterol 14-alpha-demethylase"

CDS 1..1587

/codon_start=1

/transl_table=12

```

/product="cytochrome P450 lanosterol 14-alpha-demethylase"
/protein_id="AGT98515.1"
/db_xref="GI:532528572"
/translation="MAIVDTAIDGINYFLSLSLTQQITILVVFFIYNIAWQLLYSLR
KDRVPMVFYWIWPFWSAASYGMQPYEFFEKCRILKYGDVFSFMLLGKVMTVYLGPKGHE
FIYNAKLSDVSAEEAYTHLTPVFGKGVYDCPNRLMEQKKFAKFALTDTSFKTYVP
KIREEVLYNFVNDVSFKTKERDHGVASVMKTQPEITIFTASRCLFGDEMRSFDRSFA
QLYADLDKGFTPIINFVFNLPPLPHYWRRDAAQRKISAHYMKIKRRRESGDIDPKRDL
IDSLLVNSTYKDGVMKTDQEIANLLIGVLMGGQHTSASTSAWFLHLAEQPQLQDDLY
EELTNLLKEKGGDLNDLTYEDLQKLPLVNNTIKETLRMHMPLHSIFRKVMNPLRPNT
KYVIPKGHYVLVSAGYAHTSDRWFEHPEHFNPRRWESDDTKASAVSFNSEDTVDYGFG
KISKGVSSPYLPFDGGRHRCIGEQFAYVQLGTILTTYIYNFKWRLNGDKVPDQMS
VTLPLEPAEIVWEKRDTCMV"

```

ORIGIN

```

1 atggctattg ttgatactgc cattgatggc atcaattatt tcttatcctt atcatctaact
61 caacaaatca ccatccttggg tgttttccca ttcactctaca acatagcatg gcaattactt
121 tactccttaa gaaaagatag agttccaatg gttttctact ggatcccatg gtttggttct
181 gctgctagtt atgggtatgca accatacgaa ttctttgaaa agtgtagatt gaaatatggt
241 gatgtttttt catttatggt attgggtaaa gttatgactg tttatttggg tccaaaaggt
301 cacgaattca tttacaatgc taaattatcc gatgtttctg ctgaagaagc ttatacccat
361 ttgactactc ctgttttttg taaaggtggt atttatgatt gtccaaactc tagattaatg
421 gaacaaaaga agtttgctaa atttgctttg actactgatt ctttcaaaac ctatgttcca
481 aagatcagag aagaagtttt gaattatttt gttaacgatg ttagtttcaa aaccaaggaa
541 agagaccatg gtgttgctag tggtatgaaa actcaaccag aaatcactat tttcactgct
601 tctcgttggt tatttggtga tgaaatgaga aagagtttcg acagatcatt tgctcaattg
661 tatgctgact tggataaagg tttcacccca atcaactttg ttttcccaaa cttgccatta
721 cctcattact ggagacgtga cgctgctcaa agaaagatat ctgctcatta catgaaggaa
781 attaaagaaa gaagagaaa aggtgatatt gatccaaaga gagatttgat tgattccttg
841 ttggttaact ctacttataa agatggtggt aaaatgactg atcaagaaat tgctaacctt
901 ttaatcggtg ttttgatggg tgggtcaacat acttctgctt ccacttctgc ctggttcttg
961 ttgcatttgg ctgaacaacc acaattacaa gatgatcttt acgaagaatt gaccaacttg
1021 ttgaaagaaa aggtggtgga cttgaacgat ttgacttacg aagacttgca aaaattacca
1081 ttggttaaca acactattaa agaaactttg agaatgcaca tgccattgca ttctattttc
1141 agaaaagtta tgaaccatt gagagtccca aataccaaat atgttattcc aaaaggtcac
1201 tatgtcttag tttctgccgg ttatgctcat accagtgata gatggtttga acaccagaa
1261 catttcaacc caagaagatg ggaatctgat gataccaagg ctagtgtgtt ttctttcaat
1321 tctgaagata ctgttgatta tgggttcggt aaaatttcca aggggtgtct ctctccatac
1381 ttgccattcg atggtggtag acacagatgt attggtgaac aatttgctta tgttcaattg
1441 ggaactatth tgaccactta tatctacaac ttcaaatgga gattaaacgg tgataagggt
1501 ccagatgttg attaccaatc catggttacc ttaccattag aacctgctga aattgtttgg
1561 gaaaagagaga tacttgtagt gtttag

```

ERG11 *Candida tropicalis* TP 13650.GenBank KC542326

Candida tropicalis strain TP13650 cytochrome P450 lanosterol 14- α -demethylase gene, complete cds

LOCUS KC542326 1587 bp DNA linear PLN 23-SEP-2013

DEFINITION *Candida tropicalis* strain TP13650 cytochrome P450 lanosterol 14- α -demethylase gene, complete cds.

ACCESSION KC542326

VERSION KC542326.1 GI:532528573

SOURCE *Candida tropicalis*

ORGANISM *Candida tropicalis*

Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Saccharomycotina;
Saccharomycetes; Saccharomycetales; mitosporic Saccharomycetales;
Candida.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1587)

AUTHORS Forastiero,A., Mesa-Arango,A.C., Alastruey-Izquierdo,A.,
Alcazar-Fuoli,L., Bernal-Martinez,L., Pelaez,T., Lopez,J.F.,
Grimalt,J.O., Gomez-Lopez,A., Cuesta,I., Zaragoza,O. and Mellado,E.

TITLE *Candida tropicalis* Antifungal Cross-Resistance Is Related to
Different Azole Target (Erg11p) Modifications

JOURNAL Antimicrob. Agents Chemother. 57 (10), 4769-4781 (2013)

PUBMED 23877676

REFERENCE 2 (bases 1 to 1587)

AUTHORS Alastruey-Izquierdo,A., Forastiero,A. and Mesa-Arango,A.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (25-JAN-2013) Mycology Reference Laboratory, Spanish
National Centre for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III,
Carretera de Majadahonda a Pozuelo Km.2, Majadahonda, Madrid 28220,
Spain

COMMENT ##Assembly-Data-START##

Assembly Method :: SeqMan Pro v. 8.0.2
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1587
/organism="*Candida tropicalis*"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="TP13650"
/db_xref="taxon:5482"
/country="India"
mRNA <1..>1587
/product="cytochrome P450 lanosterol 14- α -demethylase"
CDS 1..1587
/codon_start=1
/transl_table=12
/product="cytochrome P450 lanosterol 14- α -demethylase"


```

/protein_id="AGT98516.1"
/db_xref="GI:532528574"
/translation="MAIVDTAIDGINYFLSLSLTQQITILVVFFIYNIWQLLYSLR
KDRVPMVFYIWPFWSAASYGMQPYEFFEKRLKYGDVFSFMLLGKVMVTYVLGPKGHE
FIYNAKLSDVSAEEAYTHLTTPVFGKGVIFDCPNRLMEQKKFAKFALTDSFKTYVP
KIREEVLYNFVNDVSFKTKERDGHVASVMKTQPEITIFTASRCLFGDEMRSFDRSFA
QLYADLDKGFTPINFVFPNLPLPHYWRRDAAQRKISAHYMKIKRRRESGDIDPKRDL
IDSLLVNSTYKDGVKMTDQEIALLIGVLMGGQHTSASTSAWFLHLAEQPLQDDLY
EELTNLLKEKGGDLNDLTYEDLQKLPLVNNTIKETLRMHMPLHSIFRKVMNPLRPNT
KYVIPKGHYVLVSAGYAHTSDRWFEHPEHFNPRRWESDDTKASAVSFNSEDTVDYGFG
KISKGVSSPYLPFGGGRHRCIGEQFAYVQLGTILTTYIYNFKWRLNGDKVPDQSM
VTLPLEPAEIVWEKRDTCMV"

```

ORIGIN

```

1 atggctattg ttgatactgc cattgatggc atcaattatt tcttatcctt atcattaact
61 caacaaatca ccatcttggt tgttttccca ttcactctaca acatagcatg gcaattactt
121 tactccttaa gaaaagatag agttccaatg gttttctact ggatcccatg gtttggttct
181 gctgctagtt atgggatgca accatacgaa ttctttgaaa agtgcagatt gaaatatggt
241 gatgtttttt ctttatgtt attaggtaaa gttatgactg tttatttggg tccaaaagg
301 cacgaattca ttacaatgc taaattatcc gatgtttctg ctgaagaagc ttatacccat
361 ttgactactc ctgtttttgg taaagggtgt atttttgatt gtccaaactc tagattaatg
421 gaacaaaaga agtttgctaa atttgctttg actactgatt ctttcaaac ctatgttcca
481 aagatcagag aagaagtttt gaattatttt gttaacgatg ttagtttcaa aaccaaggaa
541 agagaccatg gtgttgctag tgttatgaaa actcaaccag aaatcactat tttcactgct
601 tctcgttggt tatttggtga tgaaatgaga aagagtttcg acagatcatt tgctcaattg
661 tatgctgact tggataaagg tttcaccoca atcaactttg ttttcccaa cttgccatta
721 cctcattact ggagacgtga cgctgctcaa agaaagatat ctgctcatta catgaaggaa
781 atcaagagaa gaagagaaag cggatgatatt gatccaaaga gagatttgat tgattccttg
841 ttggttaact ctacttataa agatgggtgt aaaatgactg atcaagaaat tgctaacctt
901 ttaattggtg ttttgatggg tggatcaaat acttctgctt ccacttctgc ctggttcttg
961 ttgcatttgg ctgaacaacc acaattacaa gatgatcttt acgaagaatt gaccaacttg
1021 ttgaaagaaa aggggtggtg cttgaacgat ttgacttacg aagacttgca aaaattacca
1081 ttggttaaca acactattaa agaaactttg agaatgcaca tgccattgca ttctattttc
1141 agaaaagtta tgaaccatt gagagtccca aataccaaat atgttattcc aaaaggctac
1201 tatgtcttag tttctgccg ttatgctcat accagtata gatggtttga acaccagaa
1261 catttcaacc caagaagatg ggaatctgat gataccaagg ctagtgtgtt ttctttcaat
1321 tctgaagata ctgttgatta tggtttcggt aaaatttcca aagggtgtct ctctccatac
1381 ttgccattcg gtggtggtag acacagatgt attggtgaac aatttgctta tgttcaattg
1441 ggaactatth tgaccactta tatctacaac ttcaaatgga gattaaacgg tgataagggt
1501 ccagatgttg attaccaatc catggttacc ttaccattag aacctgctga aatcgtttgg
1561 gaaaagagaga tacttgtagt gtttag

```

ERG3 *Candida tropicalis* ATCC 750. GenBank: KC542319

Candida tropicalis strain ATCC 750 C-5 sterol desaturase gene, complete cds

LOCUS KC542319 1179 bp DNA linear PLN 23-SEP-2013

DEFINITION *Candida tropicalis* strain ATCC 750 C-5 sterol desaturase gene, complete cds.

ACCESSION KC542319

VERSION KC542319.1 GI:532528559

SOURCE *Candida tropicalis*

ORGANISM *Candida tropicalis*
Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Saccharomycotina;
Saccharomycetes; Saccharomycetales; mitosporic Saccharomycetales;
Candida.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1179)

AUTHORS Forastiero,A., Mesa-Arango,A.C., Alastruey-Izquierdo,A.,
Alcazar-Fuoli,L., Bernal-Martinez,L., Pelaez,T., Lopez,J.F.,
Grimalt,J.O., Gomez-Lopez,A., Cuesta,I., Zaragoza,O. and Mellado,E.

TITLE *Candida tropicalis* Antifungal Cross-Resistance Is Related to
Different Azole Target (Erg11p) Modifications

JOURNAL Antimicrob. Agents Chemother. 57 (10), 4769-4781 (2013)

PUBMED 23877676

REFERENCE 2 (bases 1 to 1179)

AUTHORS Alastruey-Izquierdo,A., Forastiero,A., Mesa-Arango,A. and
Mellado,E.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (25-JAN-2013) Mycology Reference Laboratory, Spanish
National Centre for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III,
Carretera de Majadahonda a Pozuelo Km.2, Majadahonda, Madrid 28220,
Spain

COMMENT ##Assembly-Data-START##
Assembly Method :: SeqMan v. 8.0.2
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1179
/organism="Candida tropicalis"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="ATCC 750"
/culture_collection="ATCC:750"
/db_xref="taxon:5482"

mRNA <1..>1179
/product="C-5 sterol desaturase"

CDS 1..1179
/codon_start=1
/transl_table=12

```

/product="C-5 sterol desaturase"
/protein_id="AGT98509.1"
/db_xref="GI:532528560"
/translation="MDIVLEICDYFLFDKVYSKVFVKNGAAHEFVKNSPIIQSLSNIQ
LPKAEILDSFSTNSTILSSSSTSNFSLANVNPANIPNYLLTKIANYQDKSEIYGLAPT
FLPAGDYFDSSFLARSNIFREFLSLFIIVTTIFGWVLYFLVATLSYMFVFDNRNIFNHPR
YLKNQMSLEIGLATRAIPVMVLLTCPFFMMELHGFSLYNNIDESTGGYKALLWQFPK
FILFTDCGIYFLHRWLHWPVSVKALHKPHHKWIVCTPFASHAFHPVDGFFQSLPYHIY
PLFFPLHKVLYLFLFTFVNFWTVMIHGNYWSNDPVDVNGTACTVHHLYFNINYQGF
TLWDRLGRSYRRPDDSLFVRQQPKEIEKKVWKQQTKEMEEIRGELEGKVDDREYVSEE
"

```

ORIGIN

```

1 atggatattcg ttcttgaaat ttgtgactac tttctttttg ataaagtcta tagtaaagtt
61 ttccctaaaa acggagcagc tcatgaattt gttaaaaatt caccaattat tcaatcatta
121 tccaatattc aactcccaaa agctgaaatt ttagattcat tttctacaaa ttcaactatc
181 ttatcatctt catcaacttc aaatttctcc cttgcaaatg taaatccagc taatatccca
241 aattattttat taacaaaaat tgcaaattat caagataaat cagaaatcta cggtttagct
301 cctacttttt tgctgtctgg tgattatttc gatagtctat tcttagcaag atctaataat
361 ttcagagaat tcttatccct tttcatagtt actactatct ttggttgggt tttatatttc
421 cttgttgcta ctttatctta tatgtttggt tttgatagaa atattttcaa tcatccaaga
481 tatttgaaaa atcaaatgtc tttggaaatc ggtttggcaa ctagagccat tccagttatg
541 gttttattaa cttgtccttt ctttatgatg gaattgcatg gtttttcatt cctttactac
601 aatattgatg aatctactgg tggttataag gcacttttat ggcaatttcc taaatttatt
661 ttattttactg attgtggtat ttatttcctt cacagatggg tacattggcc aagtgtttat
721 aaagctttac ataaaccaca tcataaatgg attgtttgta ctctttttgc atcccatgct
781 ttccatccag ttgatgggtt tttccaatct ttaccatata atacttatcc attatttttc
841 ccattacata aagttttata cttgtttttg ttcacttttg tcaatttctg gactgttatg
901 attcatgatg gtaattattg gtcaaatgat ccagttgtca atggtactgc ttgtcatact
961 gttcatcatt tatatttcaa ctataactat ggtcaattca ccactttgtg ggacagatta
1021 ggtagatctt acagaagacc agatgattct ttgtttgtta gacaacaacc aaaagaaatt
1081 gaaaagaaag tttggaagca acaactaaa gaaatggaag aaattagagg tgaacttgaa
1141 ggtaaagttg atgacagaga atatgtctct gaagaatag

```

ERG3 *Candida tropicalis* ATCC 200956. GenBank: KC542320

Candida tropicalis strain ATCC 200956 C-5 sterol desaturase gene, complete cds

LOCUS KC542320 1179 bp DNA linear PLN 23-SEP-2013

DEFINITION *Candida tropicalis* strain ATCC 200956 C-5 sterol desaturase gene, complete cds.

ACCESSION KC542320

VERSION KC542320.1 GI:532528561

SOURCE *Candida tropicalis*

ORGANISM *Candida tropicalis*
Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Saccharomycotina;
Saccharomycetes; Saccharomycetales; mitosporic Saccharomycetales;
Candida.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1179)

AUTHORS Forastiero,A., Mesa-Arango,A.C., Alastruey-Izquierdo,A.,
Alcazar-Fuoli,L., Bernal-Martinez,L., Pelaez,T., Lopez,J.F.,
Grimalt,J.O., Gomez-Lopez,A., Cuesta,I., Zaragoza,O. and Mellado,E.

TITLE *Candida tropicalis* Antifungal Cross-Resistance Is Related to
Different Azole Target (Erg11p) Modifications

JOURNAL Antimicrob. Agents Chemother. 57 (10), 4769-4781 (2013)

PUBMED 23877676

REFERENCE 2 (bases 1 to 1179)

AUTHORS Alastruey-Izquierdo,A., Forastiero,A., Mesa-Arango,A. and
Mellado,E.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (25-JAN-2013) Mycology Reference Laboratory, Spanish
National Centre for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III,
Carretera de Majadahonda a Pozuelo Km.2, Majadahonda, Madrid 28220,
Spain

COMMENT ##Assembly-Data-START##
Assembly Method :: SeqMan v. 8.0.2
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1179
/organism="Candida tropicalis"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="ATCC 200956"
/culture_collection="ATCC:200956"
/db_xref="taxon:5482"

mRNA <1..>1179
/product="C-5 sterol desaturase"

CDS 1..1179
/codon_start=1
/transl_table=12
/product="C-5 sterol desaturase"
/protein_id="AGT98510.1"

```
/db_xref="GI:532528562"  
/translation="MDIVLEICDYFLFDKVYSKVFPKNGAAHEFVKNSPIIQSLSNIQ  
LPKAEILDSFSTNSTILSSSSTSNFSLANVNPANIPNYLLTKIANYQDKSEIYGLAPT  
FLPAGDYFDSSFLARSNIFREFLSLFIVTTFGWVLYFLVATLSYMFVDRNIFNHPR  
YLKNQMSLEIGLATRAIPVMVLLTCPFFMELHGFSLFYNNIDESTGGYKALLWQFPK  
FILFTDCGIYFLHRWLHWPSVYKALHKPHHKWIVCTPFAFHAFHPVDGFFQSLPYHIY  
PLFFPLHKVLYLFLFTFVNFVTVMIHGNYWSNDPVVNGTACTVHHLYFNINYGQFT  
TLWDRLGSRYPDDSLFVRQQPKEIEKKVWKQQTKEMEEIRGELEGKVDDREYVSEE  
"
```

ORIGIN

```
1 atggatatcg ttcttgaaat ttgtgactac tttctttttg ataaagtcta tagtaaagtt  
61 ttccctaaaa acggagcagc tcatgaattt gttaaaaatt caccaattat tcaatcatta  
121 tccaatatcc aactcccaaa agctgaaatt ttagattcat tttctacaaa ttcaactatc  
181 ttatcatctt catcaacttc aaatttctcc cttgcaaag taaatccagc taatatccca  
241 aattatttat taacaaaaat tgcaaattat caagataaat cagaaatcta cggtttagct  
301 cctacttttt tgcttgctgg tgattatttc gatagttcat tcttagcaag atctaataat  
361 ttcagggaat tcttatccct tttcatagtt actactattt ttggttgggt tttatatttc  
421 cttgttgcta ctttatctta tatgtttgtt tttgatagaa atattttcaa tcatccaaga  
481 tatttgaaaa atcaaagtgc tttggaaatc ggtttggcaa ctagagccat tccagttatg  
541 gttttattaa cttgtccttt ctttatgatg gaattgcatg gtttttcatt cctttactac  
601 aatattgatg aatctactgg tgggtataag gcacttttat ggcaatttcc taaatttatt  
661 ttatttactg attgtggtat ttatttcctt cacagatggt tacattggcc aagtgtttat  
721 aaagctttac ataaaccaca tcataaatgg attgtttgta ctccttttgc attccatgct  
781 ttccatccag ttgatggttt tttccaatct ttaccatata atactatcc attatttttc  
841 ccattacata aagttttata cttgtttttg ttcacttttg tcaatttctg gactgttatg  
901 attcatgatg gtaattattg gtcaaagat ccagttgtca atggtactgc ttgtcatact  
961 gttcatcatt tatatttcaa ctataactat ggtcaattca ccactttgtg ggacagatta  
1021 ggtagatctt acagaagacc agatgattct ttgtttgtta gacaacaacc aaaagaaatt  
1081 gaaaagaaaag tttggaagca acaaaactaaa gaaatggaag aaattagagg tgaacttgaa  
1141 ggtaaagttg atgacagaga atatgtctct gaagaatag
```

ERG3 *Candida tropicalis* CNM-CM 6835 GenBank: KC542321

Candida tropicalis strain CNM-CM:6835 C-5 sterol desaturase gene, complete cds

LOCUS KC542321 1179 bp DNA linear PLN 23-SEP-2013

DEFINITION *Candida tropicalis* strain CNM-CM:6835 C-5 sterol desaturase gene, complete cds.

ACCESSION KC542321

VERSION KC542321.1 GI:532528563

SOURCE *Candida tropicalis*

ORGANISM *Candida tropicalis*
 Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Saccharomycotina;
 Saccharomycetes; Saccharomycetales; mitosporic Saccharomycetales;
 Candida.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1179)

AUTHORS Forastiero,A., Mesa-Arango,A.C., Alastruey-Izquierdo,A.,
 Alcazar-Fuoli,L., Bernal-Martinez,L., Pelaez,T., Lopez,J.F.,
 Grimalt,J.O., Gomez-Lopez,A., Cuesta,I., Zaragoza,O. and Mellado,E.

TITLE *Candida tropicalis* Antifungal Cross-Resistance Is Related to
 Different Azole Target (Erg11p) Modifications

JOURNAL Antimicrob. Agents Chemother. 57 (10), 4769-4781 (2013)

PUBMED 23877676

REFERENCE 2 (bases 1 to 1179)

AUTHORS Alastruey-Izquierdo,A., Forastiero,A., Mesa-Arango,A. and
 Mellado,E.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (25-JAN-2013) Mycology Reference Laboratory, Spanish
 National Centre for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III,
 Carretera de Majadahonda a Pozuelo Km.2, Majadahonda, Madrid 28220,
 Spain

COMMENT ##Assembly-Data-START##
 Assembly Method :: SeqMan v. 8.0.2
 Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
 ##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1179
 /organism="Candida tropicalis"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="CNM-CM:6835"
 /db_xref="taxon:5482"
 /country="India"

mRNA <1..>1179
 /product="C-5 sterol desaturase"

CDS 1..1179
 /codon_start=1
 /transl_table=12
 /product="C-5 sterol desaturase"

```

/protein_id="AGT98511.1"
/db_xref="GI:532528564"
/translation="MDIVLEICDYFLFDKVSQVFPKNGAAHEFVKNSPIIQSLSNIQ
LPKAEILDSFSTNSTILSSSTSNFSLANVNPANIPNYLLTKIANYQDKSEIYGLAPT
FLPAGDYFDGSFLARSNIFREFLSLFIVTTIFGWVLYFLVATLSYMFVDRNIFNHPR
YLKNQMSLEIGLATRAIPVMVLLTCPFFMELHGFSLYNNIDESTGGYKALLWQFPK
FILFTDCGIYFLHRWLHWPSVYKALHKPHHKWIVCTPFASHAFHPVDGFFQSLPYHIY
PLFFPLHKVLYLFLFTFVNFVTVMHIDGNYWSNDPVVNGTACHTVHHLVFNINYGQFT
TLWDRLLGRSYRRPDDSLFVRQQPKEIEKKVWKQQTKEMEEIRGELEGKVDDREYVSEE
"

```

ORIGIN

```

1 atggatatcg ttcttgaaat ttgtgactac tttctttttg ataaagtcta tagtaaagtt
61 ttccctaata acggagcagc tcatgaattt gttaaaaatt caccaattat tcaatcatta
121 tccaatatcc aactcccaaa agctgaaatt ttagattcat tttctacaaa ttcaactatc
181 ttatcatctt catcaacttc aaatttctcc cttgcaaatg taaatccagc taatatccca
241 aattatttat taacaaaaat tgcaaattat caagataaat cagaaatcta cggtttagct
301 cctacttttt tgctgtctgg tgattatttc gatggttcat tcttagcaag atctaataat
361 ttcatgagaat tcttatccct tttcatagtt actactattt ttggttgggt tttatatttc
421 cttgttgcta ctttatctta tatgtttgtt tttgatagaa atattttcaa tcatccaaga
481 tatttgaaaa atcaaatgtc ttgggaaatc gggttggcaa ctagagccat tccagttatg
541 gttttattaa cttgtccttt ctttatgatg gaattgcatg gtttttcatt cctttactac
601 aatattgatg aatctactgg tgggtataag gcactcttat ggcaatttcc taaatttatt
661 ttatttactg attgtggtat ttatttcctt cacagatggt tacattggcc aagtgtttat
721 aaagctttac ataaaccaca tcataaatgg attgtttgta ctccttttgc atcccatgct
781 ttccatccag ttgatggttt tttccaatct ttaccatata atatctatcc attatttttc
841 ccattacata aggttttata cttgtttttg ttcacttttg tcaatttctg gactgttatg
901 attcatgatg gtaattattg gtcaaatgat ccagttgtca atggtactgc ttgtcatact
961 gttcatcatt tatatttcaa ctataactat ggtcaattca ccactttgtg ggacagatta
1021 ggtagatctt acagaagacc agatgattct ttgtttgtta gacaacaacc aaaagaaatt
1081 gaaaagaaag ttggaagca acaaaactaa gaaatggaag aaattagagg tgaacttgaa
1141 ggtaaagttg atgacagaga atatgtctct gaagaatag

```

ERG3 *Candida tropicalis* TP-13650. GenBank: KC542322

Candida tropicalis strain TP13650 C-5 sterol desaturase gene, complete cds

LOCUS KC542322 1179 bp DNA linear PLN 23-SEP-2013

DEFINITION *Candida tropicalis* strain TP13650 C-5 sterol desaturase gene, complete cds.

ACCESSION KC542322

VERSION KC542322.1 GI:532528565

KEYWORDS .

SOURCE *Candida tropicalis*

ORGANISM *Candida tropicalis*
 Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Saccharomycotina;
 Saccharomycetes; Saccharomycetales; mitosporic Saccharomycetales;
 Candida.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1179)

AUTHORS Forastiero,A., Mesa-Arango,A.C., Alastruey-Izquierdo,A.,
 Alcazar-Fuoli,L., Bernal-Martinez,L., Pelaez,T., Lopez,J.F.,
 Grimalt,J.O., Gomez-Lopez,A., Cuesta,I., Zaragoza,O. and Mellado,E.

TITLE *Candida tropicalis* Antifungal Cross-Resistance Is Related to
 Different Azole Target (Erg11p) Modifications

JOURNAL Antimicrob. Agents Chemother. 57 (10), 4769-4781 (2013)

PUBMED 23877676

REFERENCE 2 (bases 1 to 1179)

AUTHORS Alastruey-Izquierdo,A., Forastiero,A., Mesa-Arango,A. and
 Mellado,E.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (25-JAN-2013) Mycology Reference Laboratory, Spanish
 National Centre for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III,
 Carretera de Majadahonda a Pozuelo Km.2, Majadahonda, Madrid 28220,
 Spain

COMMENT ##Assembly-Data-START##
 Assembly Method :: SeqMan v. 8.0.2
 Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
 ##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1179
 /organism="Candida tropicalis"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="TP13650"
 /db_xref="taxon:5482"
 /country="India"

mRNA <1..>1179
 /product="C-5 sterol desaturase"

CDS 1..1179
 /codon_start=1


```

/transl_table=12
/product="C-5 sterol desaturase"
/protein_id="AGT98512.1"
/db_xref="GI:532528566"
/translation="MDIVLEICDYFLFDKVYSKVFPKNGAAHEFVKNSPIIQSLSNIQ
LPKAEILDSFSTNSTILSSSSTSNFSLANVNPANIPNYLLTKIANYQDKSEIYGLAPT
FLPAGDYFDSSFLARSNIFREFLSLFIIVTTIFGWVLYFLVATLSYMFVFDNRNIFNHPR
YLKNQMSLEIGLATRAIPVMVLLTCPFFMELHGFSLFYNNIDESTGGYKALLWQFPK
FILFTDCGIYFLHRWLHWPSVYKALHKPHHKWIVCTPFASHAFHPVDGFFQSLPYHIY
PLFFPLHKVLYLFLFTFVNFVTVMIHGNYWSNDPVVNGTACHTVHHLYFNINYGQFT
TLWDRLGSRYPDDSLFVRQQPKEIEKKVWKQQTKEMEEIRGELEGKVDDREYVSEE

```

ORIGIN

```

1 atggatatcg ttcttgaaat ttgtgactac tttctttttg ataaagtcta tagtaaagtt
61 ttccctaata acggagcagc tcatgaattt gttaaaaatt caccaattat tcaatcatta
121 tccaatatcc aactcccaaa agctgaaatt ttagattcat tttctacaaa ttcaactatc
181 ttatcatctt catcaacttc aaatttctcc cttgcaaagt taaatccagc taatatccca
241 aattatattt taacaaaaat tgcaaattat caagataaat cagaaatcta cggtttagct
301 cctacttttt tgcttgctgg tgattatttc gatagttcat tcttagcaag atctaataat
361 ttcagggaaat tcttatccct tttcatagtt actactatct ttggttgggt tttatatttc
421 cttgttgcta ctttatctta tatgtttggt tttgatagaa atattttcaa tcatccaaga
481 tatttgaaaa atcaaatgtc tttggaaatc ggtttggcaa ctagagccat tccagttatg
541 gttttattaa cttgtccttt ctttatgatg gaattgcatg gtttttcatt cctttactac
601 aatattgatg aatctactgg tgggtataag gcacttttat ggcaatttcc taaatttatt
661 ttatttactg attgtggtat ttatttcctt cacagatggt tacattggcc aagtgtttat
721 aaagctttac ataaaccaca tcataaatgg attgtttgta ctctttttgc atcccatgct
781 ttccatccag ttgatggttt tttccaatct ttaccatata atatctatcc attatttttc
841 ccattacata aagttttata cttgtttttg ttcacttttg tcaattttct gactgttatg
901 attcatgatg gtaattattg gtcaaatgat ccagttgtca atggtactgc ttgtcatact
961 gttcatcatt tatatttcaa ctataactat ggtcaattca ccactttgtg ggacagatta
1021 ggtagatctt acagaagacc agatgattct ttgtttgtta gacaacaacc aaaagaaatt
1081 gaaaagaaag tttggaagca acaaaactaa gaaatggaag aaattagagg tgaacttgaa
1141 ggtaaagttg atgacagaga atatgtctct gaagaatag

```

8.2. Comunicaciones a congresos

Resistance to Amphotericin B in *Candida tropicalis* is associated with reduced production of free radicals; 2011. **FEBS Advanced Lecture Course on Human Fungal Pathogens**. Ana Cecilia Mesa-Arango, Juan Luis Rodríguez-Tudela, Manuel Cuenca, Estrella and Oscar Zaragoza.

Virulence of *Candida tropicalis* in *Galleria mellonella* and efficacy of antifungal drugs in this infection system; 2012. **18th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology**. Ana Cecilia Mesa-Arango, Manuel Cuenca-Estrella and Oscar Zaragoza.

In vivo Amphotericin B and Voriconazole resistance of *Aspergillus lentulus* in the model host *Galleria mellonella*; 2012. **18th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology**. Mesa-Arango AC, Alastruey-Izquierdo A, Forastiero A, Gomez-Lopez A and Mellado E.

In vivo efficacy of echinocandins therapy in an invertebrate model of *Aspergillus fumigatus* infection; 2012. **18th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology**. Alastruey-Izquierdo A., Mesa A., Bernal-Martínez L., Cuenca-Estrella M and Mellado E.

Evaluation of oxidative damage induced by amphotericin B in pathogenic yeasts (AMPHORES study); 2013. **23rd ECCMID European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**. O. Zaragoza, N. Trevijano-Contador, A. Mesa-Arango and M. Cuenca-Estrella.

Candida tropicalis antifungal cross-resistance is related to mutations in the azole target (ERG11p) and alteration of ergosterol biosynthesis.; 2013. **EBS Advanced Lecture Course on Human Fungal Pathogens**. Alastruey-Izquierdo A, Alcazar-Fuoli L, Mesa-Arango A.C, Forastiero A, Lopez J.F, Grimalt J.O, Zaragoza O and Mellado E.

8.3. Publicaciones

Amphotericin B mediates killing in *Cryptococcus neoformans* through the induction of a strong oxidative burst. **Microbes and Infection; 2011.** Sangalli-Leite F, Scorzoni L, Mesa-Arango AC, Casas C, Herrero E, Gianinni MJ, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Zaragoza O.

It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. **Frontiers in Microbiology; 2012.** Mesa-Arango AC, Scorzoni L, Zaragoza.

The non-mammalian host *Galleria mellonella* can be used to study the virulence of the fungal pathogen *Candida tropicalis* and the efficacy of antifungal drugs during infection by this pathogenic yeast. **Medical Mycology; 2012.**

The non-mammalian host *Galleria mellonella* can be used to study the virulence of the fungal pathogen *Candida tropicalis* and the efficacy of antifungal drugs during infection by this pathogenic yeast

ANA CECILIA MESA-ARANGO*†, AGUSTINA FORASTIERO*, LETICIA BERNAL-MARTÍNEZ*,
MANUEL CUENCA-ESTRELLA*, EMILIA MELLADO* & OSCAR ZARAGOZA*

*Mycology Reference Laboratory, National Centre for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain, and †Group of Investigative Dermatology-GRID, University of Antioquia, Medellín, Colombia

Although *Candida tropicalis* is a frequent cause of invasive fungal diseases, its interaction with the host remains poorly studied. *Galleria mellonella* is a Lepidoptera model which offers a useful tool to study virulence of different microorganisms and drug efficacy. In this work we investigated the virulence of *C. tropicalis* in *G. mellonella* at different temperatures and the efficacy of antifungal drugs in this infection model. When larvae were infected with yeast inocula suspensions of different concentrations (4×10^6 , 2×10^6 , 10^6 and 5×10^5 cells/larva), we observed a dose-dependent effect on the killing of the insect (50% survival ranging from 1.4 ± 0.8 to 8.8 ± 1.2 days with the higher and lower inocula, respectively). *Candida tropicalis* killed *G. mellonella* larvae at both 30°C and 37°C, although at 37°C the virulence was more evident. Haemocytes phagocytosed *C. tropicalis* cells after 2 hours of infection, although the phagocytosis rate was lower when compared with other fungal pathogens, such as *Cryptococcus neoformans*. Moreover, the haemocyte density in the haemolymph decreased during infection and the yeast formed pseudohyphae in *G. mellonella*. The efficacy of amphotericin B, caspofungin, fluconazole and voriconazole was tested at different concentrations, and a protective effect was observed with all the drugs at concentrations equivalent to therapeutic dose. Fungal burden increased in infected larvae during time of infection and amphotericin B and fluconazole reduced the number of colony-forming units in the worms. Moreover, antifungal treatment was associated with the presence of cell aggregates around infected areas. We conclude that *G. mellonella* offers a simple and feasible model to study *C. tropicalis* virulence and drug efficacy.

Keywords *Candida tropicalis*, *Galleria mellonella*, phagocytosis, antifungal drugs, virulence

Introduction

Invasive fungal diseases are becoming a life-threatening problem for immunocompromised patients and are commonly caused by yeasts belonging to the genus

Candida, e.g., *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis*. *Candida tropicalis* causes around 30% of yeast infections due to non-*albicans* *Candida* species and it is the third or fourth most common species isolated from infections, depending on the geographical region [1–7]. Its incidence is associated with several risk factors, such as cancer, neutropenia, corticosteroid treatment, catheterization and administration of broad spectrum antibiotics and the infections which it causes have a particularly high mortality (around 50%) [2,8]. Although *C. tropicalis* is susceptible to amphotericin B

Received 26 April 2012; Received in final form 10 September 2012; Accepted 29 September 2012.

Correspondence: Oscar Zaragoza, Mycology Reference Laboratory, National Centre for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Carretera Majadahonda-Pozuelo, Km2, Majadahonda, 28220 Madrid, Spain. Tel.: + 34 91 8223584; Fax: + 34 91 5097966; E-mail: ozaragoza@isci.es



It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug

Ana C. Mesa-Arango^{1,2}, Liliana Scorzoní^{1,3} and Oscar Zaragoza^{1*}

¹ Mycology Reference Laboratory, National Centre for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain

² Group of Investigative Dermatology, University of Antioquia, Medellín, Colombia

³ Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-SP, Laboratório de Micologia Clínica, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Araraquara, São Paulo, Brazil

Edited by:

Carlos P. Taborda, University of São Paulo, Brazil

Reviewed by:

Marcio Rodrigues, Oswaldo Cruz Foundation, Brazil

Guilherme L. Sassaki, Universidade Federal do Paraná, Brazil

Gil Benard, University of São Paulo, Brazil

*Correspondence:

Oscar Zaragoza, Mycology Reference Laboratory, National Centre for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Carretera Majadahonda-Pozuelo, Km2, Majadahonda, 28220 Madrid, Spain.
e-mail: ozaragoza@isci.es

"Amphotericin B acts through pore formation at the cell membrane after binding to ergosterol" is an accepted dogma about the action mechanism of this antifungal, and this sentence is widely found in the literature. But after 60 years of investigation, the action mechanism of Amphotericin B is not fully elucidated. Amphotericin B is a polyene substance that is one of the most effective drugs for the treatment of fungal and parasite infections. As stated above, the first mechanism of action described was pore formation after binding to the ergosterol present in the membrane. But it has also been demonstrated that AmB induces oxidative damage in the cells. Moreover, amphotericin B modulates the immune system, and this activity has been related to the protective effect of the molecule, but also to its toxicity in the host. This review tries to provide a general overview of the main aspects of this molecule, and highlight the multiple effects that this molecule has on both the fungal and host cells.

Keywords: amphotericin B, pore, oxidative damage, immunomodulation, fungal infection

INTRODUCTION

The control of invasive fungal infections is based on the use of antifungal drugs, being polyenes, azoles, and echinocandins the main families used in clinical practice. Among these, polyenes are the drugs that have been in use for a longer time, since they were first described in the middle of the twentieth century (Oura et al., 1955). The main polyene used as antifungal drug is Amphotericin B (AmB), which is an amphipatic macrolide. This molecule was discovered in 1950s after a broad screening of *Streptomyces* cultures that contained antifungal activity. The AmB-producing organism was isolated from a soil sample taken from the Orinoco River region (Venezuela) and was identified as *Streptomyces nodosus* (Trejo and Bennett, 1963). An intravenous presentation was introduced in the market in 1958 as a sodium deoxycholate solution (D-AmB) (Fungizone-Squibb), which forms a micellar suspension when reconstituted in glucose solution.

AmB has been used for the treatment of fungal infections and, despite the toxicity and the development of other antifungals, such as azoles and echinocandins, this drug remains as the first line treatment for severe and life threatening systemic infections such as cryptococcal meningitis and invasive zygomycosis (Saag et al., 2000; Waness et al., 2009). AmB is also effective for other mycoses such as aspergillosis, candidiasis, histoplasmosis, blastomycosis, coccidioidomycosis, sporotrichosis, fusariosis, and phaeohyphomycosis in the cases of lack of response to azoles or echinocandins (Ellis, 2002; Davis and Porter, 2005; Metcalf and Dockrell, 2007; Chandrasekar, 2008; Gomez-Lopez et al., 2008; Muhammed et al., 2011). Additionally, AmB has activity

against parasites as *Trypanosoma cruzi*, *Schistosoma mansoni*, *Echinococcus multilocularis*, and *Leishmania* spp, being the second drug of choice for the treatment for visceral leishmaniasis when antimonials fail or cannot be used (Yardley and Croft, 1999; Reuter et al., 2003; Mone et al., 2010; Paila et al., 2010). Also an amphotericin-derived drug, MS8209, has effect against HIV-1 infection avoiding virus entry to the cell (Pleskoff et al., 1995).

The D-AmB formulation has been considered the gold standard for many years and it has broad-spectrum activity. Unfortunately, this formulation is highly nephrotoxic and shows side effects as fevers, malaise, weight loss, headache, hypotension, abdominal pain, nausea, vomiting, diarrhea, normochromic normocytic anemia, and myalgia (Sabra and Branch, 1990; Meunier et al., 1991; Ringden et al., 1991; Gulati et al., 1998; Laniado-Laborin and Cabrales-Vargas, 2009). For this reason, new formulations have been introduced in the last years (Lopez-Berestein et al., 1985; Bohme and Hoelzer, 1996; Gulati et al., 1998; Rust and Jameson, 1998; Walsh et al., 1998; Dupont, 2002). The new presentations have reduced toxicity because they are lipid-carried presentations. These last formulations include a colloidal dispersion with cholesterol sulphate (CD-AmB, Amphotec), a lipidic complex with two phospholipids (LC-AmB, Abelcet) and liposomal AmB (L-AmB, Ambisome), which is integrated into true unilamellar liposomes (Veerareddy and Vobalaboina, 2004; Torrado et al., 2008). These different formulations differ in their price and in the associated toxicity. Lipid-based formulations, and in particular, L-AmB, have reduced nephrotoxicity and have superior efficacy than conventional AmB (Gulati et al., 1998; Saliba and Dupont, 2008).

MECHANISM OF ACTION OF AMPHOTERICIN B

The mechanism of action of AmB still is not completely elucidated. AmB has effects on the fungal cell at two different levels: Binding to the ergosterol at the membrane, inducing pore formation and ergosterol sequestration, and induction of oxidative damage. In the following sections we will summarize how AmB exerts these two effects on the fungal cells, which are also summarized in **Figure 1**.

EFFECTS ON THE FUNGAL MEMBRANE: PORE FORMATION AND ERGOSTEROL SEQUESTRATION

Early studies suggested that AmB inserts into the fungal lipid bilayer through the hydrophobic domains that bind to ergosterol. As a consequence, multimeric pores are formed, with the lipophilic polyene chains of the antifungal in contact with membrane lipids (Finkelstein and Holz, 1973; Brajtburg et al., 1990). AmB pores increase the permeability of the fungal membrane to small cations as K^+ , Ca^{2+} , and Mg^{2+} promoting the rapid depletion of intracellular ions and fungal cell death (Kinsky, 1970).

AmB can also bind to other sterols, such as cholesterol, but with a lower affinity (Hsueh and Feingold, 1973).

Recently, it was proposed that AmB can exert its action through two complementary mechanisms depending on the interaction of AmB and sterols: membrane permeabilization and sterol sequestration (Palacios et al., 2011). In this sense, it has been proposed that cholesterol sequestration in the host membrane avoids macrophage–parasite interaction in *Leishmania* infection as a novel mechanism for AmB in visceral leishmaniasis (Chattopadhyay and Jafurulla, 2011).

Analytical studies have demonstrated that AmB forms two different types of pores, which differ in their substrate specificities and that are formed at different moments. Moreover, they participate differentially in the killing effect of the molecule [see seminal review in Cohen (2010) and Hartsel et al. (1994); Romero et al. (2009)]. After addition of AmB to the cells, the first type of pores that are formed are non-aqueous, which are permeable to monovalent cations and have lower permeability to monovalent anions (Ramos et al., 1996; Romero et al., 2009). Afterwards,

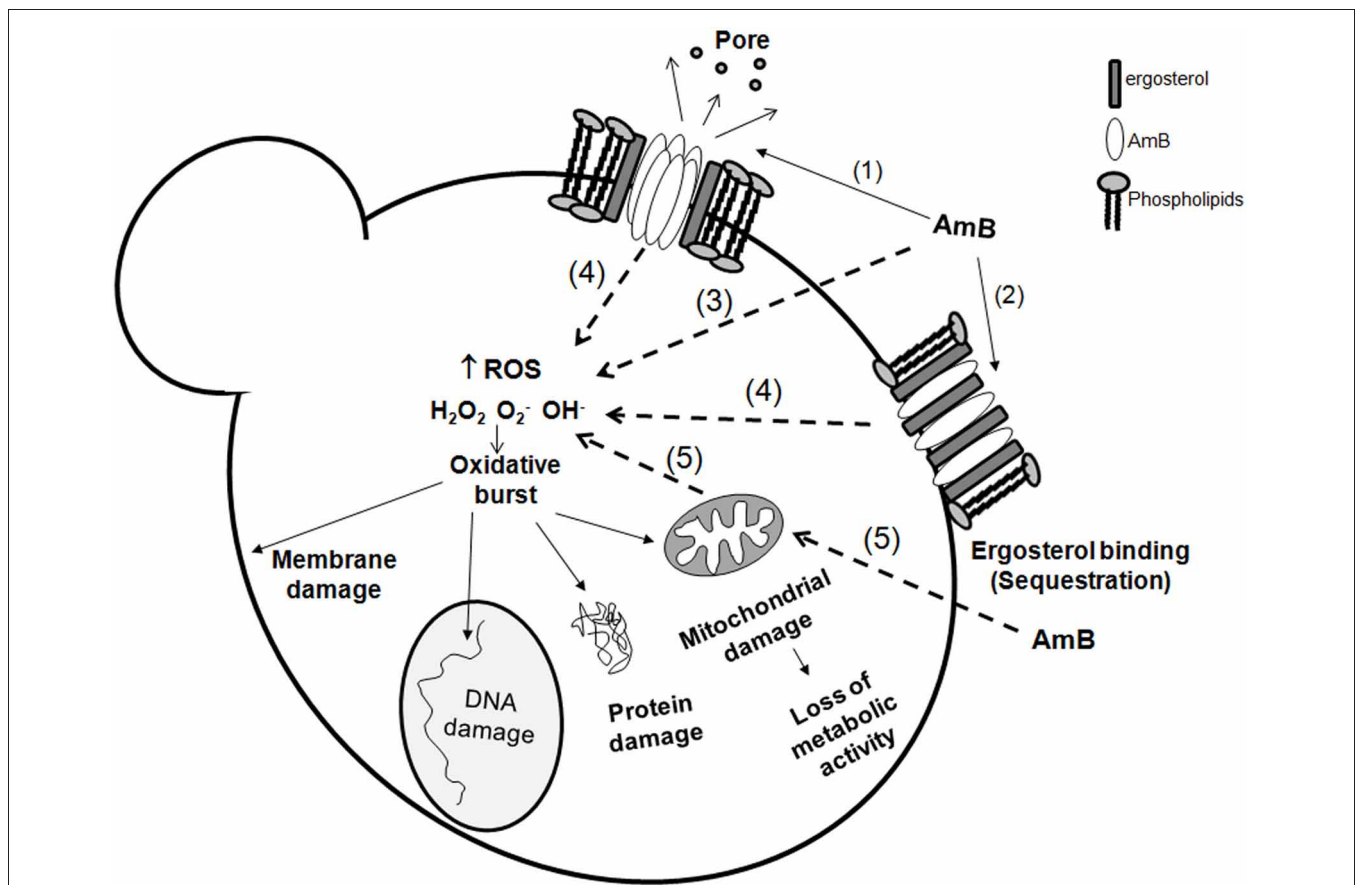


FIGURE 1 | Amphotericin B action mechanisms on fungal cells.

Amphotericin B exerts its action at different levels on the cell: membrane effects and intracellular effects. At the membrane, it can bind to ergosterol (1) and form pores, or merely induce ergosterol sequestration (2) resulting in membrane stability disruption. In the cell, AmB also induces an oxidative burst. The mechanism of this induction remains unknown, but there are several possibilities: AmB can act directly as a prooxidant (3) and induce

accumulation of reactive oxygen species (ROS). However, it is also possible that this intracellular effect requires previous binding to ergosterol (4). Since ROS are natural products of the respiratory chain, it cannot be discarded that AmB influences the mitochondrial activity (5), and contribute in this way to the oxidative burst. The accumulation of free radicals has multiple deleterious effects on the essential components of the cell (membrane, proteins, DNA and mitochondria) resulting in cell death.

aqueous-pores are formed, which are permeable to monovalent cations and anions and large electrolytes, such as glucose (Cohen and Gamargo, 1987; Ramos et al., 1989; Cohen et al., 1990; Cohen, 1992). The formation of pores is a very rapid process, and occurs in milliseconds. Furthermore, although AmB has affinities for both ergosterol and cholesterol (Hsuchen and Feingold, 1973), pore formation is delayed in liposomes formed with cholesterol (Mouri et al., 2008). The ergosterol and cholesterol content also determines the concentration at which AmB forms aqueous or non-aqueous pores, indicating that membrane composition has a profound effect on the AmB action (Mouri et al., 2008).

Ergosterol is required for multiple processes, such as endocytosis, vacuole fusion, and stabilization of proteins at the cell membrane (Heese-Peck et al., 2002; Zhang et al., 2010). So binding of AmB to these molecules could account for the toxic effect of the antifungal by a mechanism that involves ergosterol sequestration. This idea is supported by a recent work (Gray et al., 2012) that demonstrated that channel formation by AmB is a secondary mechanism that enhances the activity of the drug, but is not required to induce killing in the fungal cells. Using different forms of AmB that had been chemically modified, it was found that modifications that affect pore formation do not affect its antifungal activity. In this sense, it has been shown that other polyenes, such as natamycin, have antifungal effects that are not related to pore formation (Te Welscher et al., 2010).

INDUCTION OF OXIDATIVE DAMAGE

Although it is well established that AmB binds to sterols and forms pores, there are numerous articles that indicate that increased permeability might not be the only mechanism responsible for the killing effect of the molecule. Early studies found that there was not correlation between the lethal effect of different polyenes on *C. albicans* and the degree of potassium release by the cells, suggesting that pore formation does not correlate with killing of the cells (Chen et al., 1978; Sokol-Anderson et al., 1986). This finding indicates that the formation of non-aqueous (cation-selective) pores is not enough to induce killing of the cells, and suggests that AmB elicits other killing mechanism. In this sense, it has been observed that the biological effect of AmB is very complex and depends on a variety of factors, such as the growth phase of fungi (Gale, 1974; Gale et al., 1975; Mowat et al., 2008) and the presence of oxygen (Gale et al., 1977; Sokol-Anderson et al., 1986). These data suggest that AmB action depends on metabolic factors, and indicate that the action mechanism is more complex than binding to ergosterol and pore formation. In fact, some studies argue against the idea that pore formation is the main killing mechanism. Chemical modifications of the AmB molecule that interfere with its ability to form pores do not affect its fungicidal activity (Palacios et al., 2007), which provides strong evidence that pore formation is not essential for the function of the molecule.

In agreement with the idea that AmB has other toxic mechanism than pore formation at the membrane, it has been shown that this antifungal induces oxidative stress in the cells (Sokol-Anderson et al., 1986; Haido and Barreto-Berger, 1989; Sangalli-Leite et al., 2011). An early study demonstrated that addition of free radicals scavengers, such as catalase and/or superoxide dismutase,

protects *C. albicans* protoplasts from the lytic effect of AmB (Sokol-Anderson et al., 1986). Genome-wide expression analysis confirmed that AmB, not only has an effect on the expression of genes involved in ergosterol synthesis pathway, but also induces the expression of stress genes (Liu et al., 2005), providing another evidence that AmB has pleiotropic effects in the fungal cells.

The induction of oxidative damage in the cells has been frequently reported in the literature using independent approaches. The direct production of free radicals by AmB has been measured using probes that emit fluorescence after being attacked by the free radicals, such as dihydrofluorescein diacetate or dihydrorhodamine 123 (Phillips et al., 2003; Sangalli-Leite et al., 2011). Lipid peroxidation, protein carbonylation, and apoptotic-like phenotypes (such as DNA fragmentation and annexin V staining) have been also used as indicators of oxidative stress generated by AmB in fungal cells (Phillips et al., 2003; Mousavi and Robson, 2004; Blum et al., 2008; Al-Dhaheer and Douglas, 2010; Sharma et al., 2010; Sangalli-Leite et al., 2011).

The role of oxidative damage in the antifungal effect of AmB is still unknown, but different studies suggest that this mechanism participates in this effect. A recent study demonstrates that killing of *C. neoformans* cells, measured by propidium iodide uptake, occurs after the induction of an oxidative burst. The mechanism by which AmB induces oxidative burst in the cells remains unknown. Several studies demonstrate that AmB can autooxidize, which suggests a mechanism by which AmB induces oxidative stress in the cells (Lamy-Freund et al., 1985; Sokol-Anderson et al., 1986). On the other hand, it has been demonstrated that AmB can also act as an antioxidant similar to carotenoid and retinoids (Osaka et al., 1997).

AmB induces oxidative damage in organisms others than fungi (Haido and Barreto-Berger, 1989). Moreover, this feature of the antifungal has been related to the reduction in virulence observed in some parasite infection models. For example, AmB does not have a direct effect on development of the miracidia (larval stages) and sporocyst of the parasite *Schistosoma mansoni*, but it decreases its infectivity through a process linked to the oxidative damage induced by the antifungal that impaired the response of the parasite during infection (Mone et al., 2010).

MECHANISMS OF RESISTANCE TO AmB

Acquired resistance to AmB is very low despite its widespread use. Secondary resistance has been described in *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. lusitanae*, and *C. haemulonii* (Powderly et al., 1988; Ellis, 2002). In contrast, in the last years, there has been an increase in the incidence of infections caused by fungi intrinsically resistant to AmB, such as *A. terreus*, *Fusarium* spp, and *Scedosporium prolificans* (Cuenca-Estrella et al., 1999; Sutton et al., 1999; Khan et al., 2007; Rogasi et al., 2007).

Resistance to this antifungal is achieved in different ways. Decrease in ergosterol content results in resistance to this compound (Kim and Kwon-Chung, 1974; Kim et al., 1974; Woods et al., 1974; Safe et al., 1977; Drutz and Lehrer, 1978; Merz and Sandford, 1979; Kreiner et al., 1993; Kelly et al., 1994; Currie et al., 1995; Ghannoum and Rice, 1999; Walsh et al., 2003; Vandeputte et al., 2007). Most of these studies showed alterations in the ergosterol synthesis pathway and accumulation of sterol intermediates.

Moreover, in biofilms (which are microbial populations that grow attached to a surface and have reduced susceptibility to antimicrobials), resistance to AmB has been associated not only to a decrease in the ergosterol content, but also to changes in the cell wall (Khot et al., 2006). Since azoles inhibit ergosterol synthesis, cross resistance between azole and AmB has been described in the literature (Sud and Feingold, 1983; Kelly et al., 1996, 1997; Nolte et al., 1997; Sanglard et al., 2003).

However, other studies did not find a correlation between ergosterol content and susceptibility to AmB (Joseph-Horne et al., 1996a,b; Dannaoui et al., 2000). In agreement, it has been shown that pre-exposure of *C. albicans* cells to fluconazole can protect the yeasts from AmB treatment, and this effect is still present when ergosterol is added to the medium, suggesting that this resistance phenotype does not depend on ergosterol (Vazquez et al., 1998). Interestingly, it has been recently shown that sub-inhibitory concentrations of fluconazole induce a response in yeast that confer resistance to oxidative and nitrosative stress (Arana et al., 2010), which supports the idea that adaptation to oxidative stress can result in AmB tolerance. Resistance to AmB has been also studied using genome-wide expression analysis in *C. albicans* (Barker et al., 2004). This work demonstrated that resistance to AmB and fluconazole was associated, not only with an increase in the expression of *ERG* genes, but also with the induction of stress genes such as catalase, and reduction of mitochondrial enzymes, such as cytochrome c oxidase and acetyl CoA synthetase, suggesting that resistance to AmB could be associated to a decrease in mitochondrial activity and reactive oxygen intermediates (ROIs) production.

A strong support for the role of oxidative damage in the antifungal activity of the drug is provided by the relationship between resistance to AmB and to oxidant stress. This was first described in *C. albicans*, where it was observed that resistant strains to AmB had reduced susceptibility to H₂O₂ (Sokol-Anderson et al., 1988). In this work, resistance to AmB and H₂O₂ correlated with increased catalase activity. Another evidence of the importance of the oxidative damage was provided in the filamentous fungi *Aspergillus terreus*, which is considered intrinsically resistant to AmB. This fungus has similar ergosterol levels than a susceptible species, such as *A. fumigatus* (Dannaoui et al., 2000; Blum et al., 2008). However, AmB did not induce lipid peroxidation in *A. terreus*, suggesting that this fungus has an induction in antioxidant mechanisms. In agreement, catalase activity in *A. terreus* was significantly higher in this fungus than in *A. fumigatus* (Blum et al., 2008).

The respiratory chain in the mitochondria plays a key role in the production of free radicals in the cells because these molecules are subproducts of the respiration. So it is tempting to correlate the effect of AmB with the mitochondrial activity. Little is known about this correlation, but it has been demonstrated that disruption of respiratory function results in increased resistance to AmB in *C. albicans* (Geraghty and Kavanagh, 2003). This finding is very relevant, especially because the mitochondria is not only required for the accumulation of free radicals, but also because it is necessary for ergosterol biosynthesis, so changes in mitochondrial activity can influence the antifungal activity of AmB at multiple levels.

AmB AS A MOLECULE WITH IMMUNOMODULATORY PROPERTIES

Antifungal drugs are derived from natural compounds with complex structure, and many of them have other effects than growth inhibition or killing of fungi. In this sense, antifungals have immunomodulatory properties [see review in Ben-Ami et al. (2008)]. AmB is a good example about this type of drugs. Besides the direct action on the fungal cell, several studies have shown that AmB has a potent immunomodulatory effect on the host cells. This has been demonstrated *in vitro* in different cellular lines from human and murine models, such as polymorphonuclear neutrophils (PMNs), macrophages, NK cells, T, B, and tumoral cells, but also *in vivo* in animal models. The immunomodulatory properties offer an alternative action mechanism for this antifungal by enhancing the immune response of the host. But at the same time, this effect has been related to toxicity associated to this drug. In the following sections, we will briefly review the main immunomodulatory properties of AmB.

IMMUNOMODULATION *IN VITRO* AND *IN VIVO*

Multiple studies performed *in vitro* and *in vivo* have demonstrated that AmB has an effect on the host, not only in the presence of the pathogen, but also when uninfected cell lines or animals are treated with the antifungal. AmB stimulates transcription and production of multiple mediators of the immune system (such as cytokines, chemokines, and prostaglandins) and ICAM-1 in murine and human cells (Borden and Leonhardt, 1976; Sculier and Body, 1991; Cleary et al., 1992; Louie et al., 1994; Saxena et al., 1999; Rogers et al., 2000; Sau et al., 2003; Camacho et al., 2004; Simitsopoulou and Roilides, 2005; Simitsopoulou et al., 2005). Moreover, this antifungal upregulates the expression of genes involved in angiogenesis (Lin et al., 2009). AmB also induces the accumulation of nitric oxide (NO) (Mozaffarian et al., 1997) and ROIs (Wilson et al., 1991). Most of these effects are summarized in **Figure 2**. In endothelial activated cells, AmB increases iNOS expression mediated by endogenous IL-1 and, in consequence, AmB augments the production of NO, which plays important role in vasodilation and protection against pathogens (Suschek et al., 2002).

The immunomodulatory properties and the proinflammatory effect induced by AmB have been associated with protective effects during infection. AmB enhances the antifungal activity of PMN and pulmonary alveolar macrophages against conidia and/or hyphal phase of *A. fumigatus* (Roilides et al., 2002). Similar results were published with murine peritoneal macrophages pre-treated with IFN- γ and different doses of AmB. In this case AmB induced the production of NO, TNF- α , and IL-1, that enhanced the anticryptococcal activity of these cells (Tohyama et al., 1996).

Macrophage oxidative burst, leading to O₂⁻ release, is activated *in vivo* after intraperitoneal injections of recombinant IFN- γ and TNF- α or AmB (Wolf and Massof, 1990). Moreover, when AmB was combined with IFN- γ , a synergic effect was observed, suggesting that IFN- γ may serve as a useful adjuvant during the treatment of intracellular fungal infections.

AmB also produces oxidative burst in macrophages following stimulation with phorbol myristate acetate. This effect was

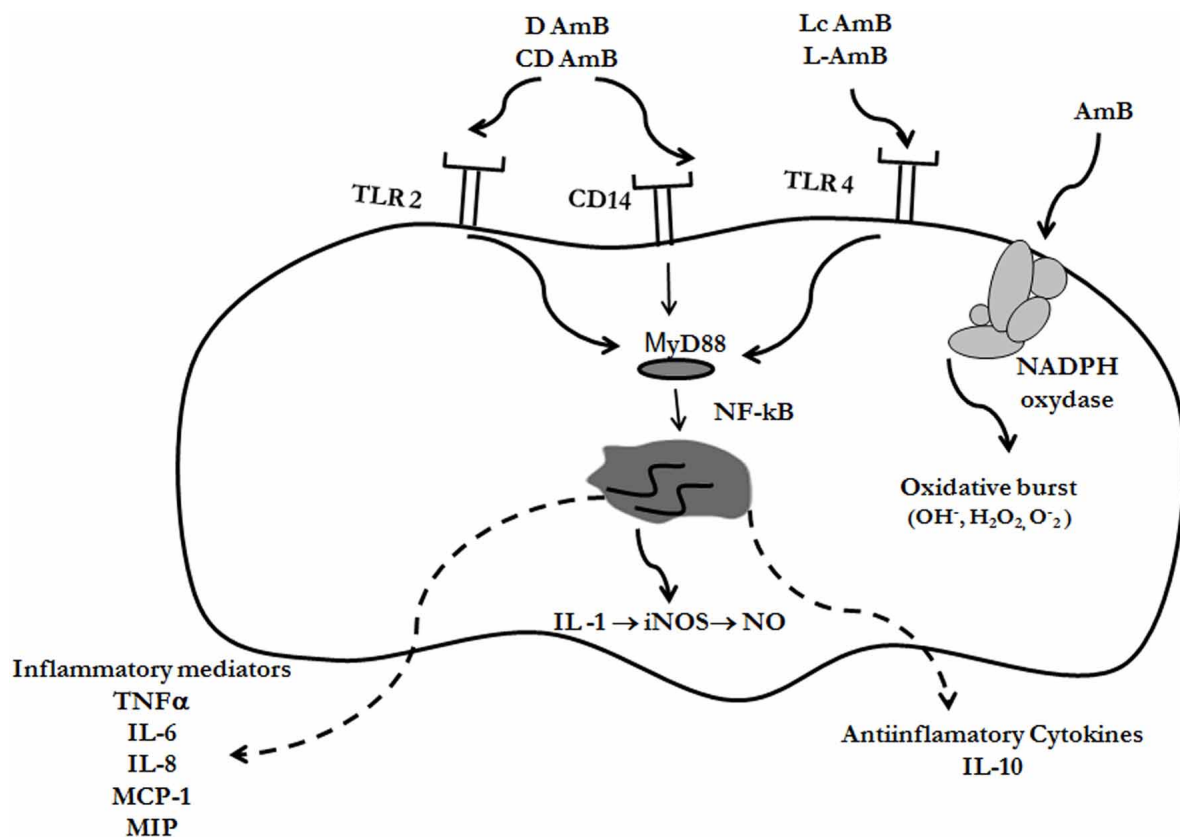


FIGURE 2 | Immunomodulatory effects of AmB. Different formulations of AmB can bind to Toll-like receptors (TLR-2 or TLR-4) or CD14, resulting in immunomodulation of the cell. The signal is transduced through the adaptor protein MyD88, and as a final effect, NF-κB is activated and translocated to the nucleus. In this way, cytokines are expressed,

which can be pro- or anti-inflammatory, depending on the AmB formulation, and receptors involved (see text for further details). AmB also induce the accumulation of free radicals (reactive oxygen intermediates, ROIs, and nitric oxide, NO) through induction of NO synthase and NADPH oxidase

related to the binding of the antifungal to the membrane that could in turn induce conformational changes that activate membrane enzymes involved in the induction of oxidative burst, such as NADPH oxidase (Chapman and Hibbs, 1978; Wilson et al., 1991). AmB also has a cooperative effect with IFN-γ in enhancing the candidastatic activity of the macrophages through a process that involves the accumulation of ROIs (Coste et al., 2002). However, the same authors also noticed that AmB had a cooperative effect with IL-13, but this effect was independent of ROIs, indicating that AmB can activate macrophages in different ways.

The outcome of systemic and mucosal fungal infections depends on the Th response of the host. Th1 response (which depends on proinflammatory cytokines TNF-α, IFN-γ, IL-1, IL-6) leads to resistance because it primes the immune system with macrophage inflammatory activation and superoxide and NO production. In contrast, a Th2 response (IL-10, IL-4, IL-2, IL-13, and IL-5) is associated with susceptibility to infection and disease enhancement (Puccetti et al., 1995; Romani and Howard, 1995). To evaluate the effect of AmB on the Th cell response, mice with disseminated or gastrointestinal candidiasis were treated with antifungal alone or in combination with an IL-4 antagonist,

and the production of IFN-γ (Th1) and IL-4 (Th2) was evaluated. AmB induced a protective Th1 response with concomitant IL-4 depletion (Cenci et al., 1997). Similar results were observed in Balb/c mice infected with *A. fumigatus* spores and treated with AmB (Saxena et al., 1999). In agreement, it was described that AmB induces up-regulation of IL-1β and TNF-α in mouse kidney (Falk et al., 2005). The idea that AmB exerts part of its effect through immunomodulation was supported by the fact the antifungal shows a defect in the protection when mice receive neutralizing TNF-α antibodies (Louie et al., 1995).

Since changes in the immune response could have profound consequences in the host, the immunomodulatory properties of AmB can explain some of the secondary effects of the molecule. For example, the increase in proinflammatory cytokines has been correlated with the toxicity of AmB (Chia and McManus, 1990; Cleary et al., 1992; Arning et al., 1995; Shadkhan et al., 2004). In addition, direct renal toxicity has been described by the induction of apoptosis and alterations in the expression of the constitutive NO synthase (Suschek et al., 2000; Falk et al., 2005; Yano et al., 2009).

AmB has been occasionally described to have immunosuppressor effects. In the human THP-1 monocytic cell line, pretreatment

with AmB and challenge with *A. fumigatus* conidia results in reduced expression of TNF- α (Choi et al., 2010). Also Becker et al. observed decrease of IL-6, macrophage inflammatory protein (MIP-2), and monocyte chemoattractant protein (MCP-1) in neutropenic rats with invasive pulmonary aspergillosis treated with AmB (Becker et al., 2003).

MECHANISMS BY WHICH AmB INDUCES IMMUNOMODULATION

The mechanism by which AmB produces immunomodulation and induction of ROIs and NO is not fully elucidated. As stated above, AmB binds to the mammalian membrane because it presents affinity to cholesterol, and in this way, it could induce conformational changes that activate the NADPH oxidase enzyme (Chapman and Hibbs, 1978; Wilson et al., 1991) (Figure 2). But the mechanism that better explains the immunomodulatory effects of AmB is mediated through the Toll-like receptor (TLRs) signaling pathway (Figure 2). TLRs are members of a conserved family of mammalian receptors that recognize microbial products, being TLR2 and TLR4 the best characterized. TLR2 presents affinity for Gram-positive bacteria, peptidoglycan, lipoteichoic acid, and zymosan, whereas TLR4 ligands include LPS from Gram-negative bacteria, Taxol, and *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide (Shoham et al., 2001; Janeway et al., 2005). AmB can bind to TLR, resulting in cytokine and chemokine release. Binding to TLR2 has been associated to release of proinflammatory cytokines, while binding to TLR4 produced release of anti-inflammatory (Bellocchio et al., 2005). Binding of AmB to the TLRs triggers polymerization of receptors which results in recruitment of the adaptor protein, MyD88. This signaling produces the nuclear translocation of NF- κ B, which induces the expression of genes involved in macrophage activation. In addition, AmB also exerts its immunomodulatory effect through CD14 (Trajkovic et al., 2001; Sau et al., 2003), which is a receptor that activates the TLR signaling pathway after binding to LPS.

EFFECT OF THE AmB FORMULATIONS ON THE IMMUNOMODULATORY PROPERTIES

The immunomodulatory properties of AmB depend on the clinical presentation used in the treatment. In a study using plasma of patients treated with different presentations, it was found that D-AmB and L-AmB increased TNF- α , IL-6, and IL-1-RA, but this effect was not observed when patients were treated with CD-AmB (Arning et al., 1995). In human monocytes D-AmB and CD-AmB induced up-regulation of inflammatory cytokines such as IL-1, TNF- α , monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1), and macrophage inflammatory protein 1 (MIP-1), while LC-AmB lipid complex and L-AmB down-regulated or had no effect on the gene expression of these proinflammatory cytokines (Simitopoulou et al., 2005). Moreover, D-AmB is more effective than LC-AmB in enhancing PMN oxidative activity and D-AmB induced higher expression of CD11b/CD18 integrin (Mac-1) (Sullivan et al., 1992). On the other hand, using antibody arrays, both D-AmB and CD-AmB induced proinflammatory cytokines in the THP-1 monocytic cell line (IL-8, TNF- γ , MCP-1, and RANTES) while

LC-AmB and L-AmB had no effect (Turtinen et al., 2004). This difference between the AmB formulations can be explained by the type of TLR to which the different AmB presentations bind. D-AmB binds to TLR2, which induces a pro-inflammatory response, in contrast to L-AmB which induces anti-inflammatory effect after binding to TLR4 in PMNs (Bellocchio et al., 2005).

CONCLUSIONS AND FUTURE PERSPECTIVES

AmB is still an enigmatic molecule, and although it has been vastly used for the treatment of fungal infections during decades, there are still aspects about its action mechanism that remain unknown. Although the first studies demonstrated that this drug binds to sterols and in particular, ergosterol, and forms pores at the membrane, it has been also shown that AmB induces oxidative damage in the cells. There are contradictory data about the importance of these mechanisms. The fact that resistance to this antifungal correlates with different mechanisms, such as a reduction in ergosterol content or induction of antioxidant enzymes indicates that most probably both are required for the killing effect of the molecule. At the moment, it is not possible to know if these mechanisms are related or are independent, although a tempting hypothesis is that binding to ergosterol is necessary not only for pore formation, but also for the induction of oxidative damage. Further studies are required to clarify the importance of each mechanism. In addition, the induction of different killing mechanisms is in agreement with the fact that AmB is the antifungal drug with a stronger fungicidal activity. To make the situation more complex, AmB has also strong immunomodulatory properties, and in particular, it induces proinflammatory responses. This effect has been associated with protective effects, but also with the toxicity. The immunomodulatory properties of the antifungal open many questions about how AmB acts during infection, not only on the pathogen, but also on the host. This issue is of particular interest because patients affected by fungal infections are immunocompromised. So it is important to consider that AmB may have different effects on patients with different immunological states and therefore, the antifungal treatment could have unpredicted consequences in the outcome of the disease. Although AmB is one of the most effective treatments for fungal infections and secondary clinical resistance remains low, there is an increase in the incidence of pathogens that have intrinsic resistance to this antifungal, such as *Trichosporon* spp, *A. terreus* and *Scedosporium prolificans*, so more studies are required to understand the basis of intrinsic resistance and to provide an efficient strategy for the management of these infections.

ACKNOWLEDGMENTS

Ana C. Mesa-Arango is funded by a grant from Fundación Carolina and University of Antioquia, Medellín, Colombia, and Liliana Scorzoni is supported by fellowship from the Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo. Oscar Zaragoza is funded by grant SAF2011-25140 from the Spanish Ministry for Economics and Competitiveness.

REFERENCES

- Al-Dhaheri, R. S., and Douglas, L. J. (2010). Apoptosis in *Candida* biofilms exposed to amphotericin B. *J. Med. Microbiol.* 59, 149–157.
- Arana, D. M., Nombela, C., and Pla, J. (2010). Fluconazole at sub-inhibitory concentrations induces the oxidative- and nitrosative-responsive genes TRR1, GRE2 and YHB1, and enhances the resistance of *Candida albicans* to phagocytes. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 54–62.
- Arning, M., Kliche, K. O., Heer-Sonderhoff, A. H., and Wehmeier, A. (1995). Infusion-related toxicity of three different amphotericin B formulations and its relation to cytokine plasma levels. *Mycoses* 38, 459–465.
- Barker, K. S., Crisp, S., Wiederhold, N., Lewis, R. E., Bareither, B., Eckstein, J., Barbuch, R., Bard, M., and Rogers, P. D. (2004). Genome-wide expression profiling reveals genes associated with amphotericin B and fluconazole resistance in experimentally induced antifungal resistant isolates of *Candida albicans*. *J. Antimicrob. Chemother.* 54, 376–385.
- Becker, M. J., De Marie, S., Fens, M. H., Verbrugh, H. A., and Bakker-Woudenberg, I. A. (2003). Effect of amphotericin B treatment on kinetics of cytokines and parameters of fungal load in neutropenic rats with invasive pulmonary aspergillosis. *J. Antimicrob. Chemother.* 52, 428–434.
- Bellocchio, S., Gaziano, R., Bozza, S., Rossi, G., Montagnoli, C., Perruccio, K., Calvitti, M., Pitzurra, L., and Romani, L. (2005). Liposomal amphotericin B activates antifungal resistance with reduced toxicity by diverting Toll-like receptor signalling from TLR-2 to TLR-4. *J. Antimicrob. Chemother.* 55, 214–222.
- Ben-Ami, R., Lewis, R. E., and Kontoyannis, D. P. (2008). Immunocompromised hosts: immunopharmacology of modern antifungals. *Clin. Infect. Dis.* 47, 226–235.
- Blum, G., Perkhof, S., Haas, H., Schrettel, M., Wurzner, R., Dierich, M. P., and Lass-Flörl, C. (2008). Potential basis for amphotericin B resistance in *Aspergillus terreus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 1553–1555.
- Bohme, A., and Hoelzer, D. (1996). Liposomal amphotericin B as early empiric antimycotic therapy of pneumonia in granulocytopenic patients. *Mycoses* 39, 419–426.
- Borden, E. C., and Leonhardt, P. H. (1976). Enhancement of *IL-1*: *IL-2*-induced interferon production by amphotericin B. *Antimicrob. Agents Chemother.* 9, 551–553.
- Brajtburg, J., Powderly, W. G., Kobayashi, G. S., and Medoff, G. (1990). Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34, 183–188.
- Camacho, M., Gerboles, E., Soler, M., and Vila, L. (2004). Modification of prostanoid secretion in endothelial cells by amphotericin B acting synergistically with interleukin-1 β : possible explanation of proinflammatory effects. *J. Infect. Dis.* 190, 1026–1032.
- Cenci, E., Mencacci, A., Del Sero, G., Bistoni, F., and Romani, L. (1997). Induction of protective Th1 responses to *Candida albicans* by antifungal therapy alone or in combination with an interleukin-4 antagonist. *J. Infect. Dis.* 176, 217–226.
- Chandrasekar, P. (2008). Amphotericin B lipid complex: treatment of invasive fungal infections in patients refractory to or intolerant of amphotericin B deoxycholate. *Ther. Clin. Risk Manag.* 4, 1285–1294.
- Chapman, H. A. Jr., and Hibbs, J. B. Jr. (1978). Modulation of macrophage tumoricidal capability by polyene antibiotics: support for membrane lipid as a regulatory determinant of macrophage function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 4349–4353.
- Chattopadhyay, A., and Jafurulla, M. (2011). A novel mechanism for an old drug: amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 416, 7–12.
- Chen, W. C., Chou, D. L., and Feingold, D. S. (1978). Dissociation between ion permeability and the lethal action of polyene antibiotics on *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 13, 914–917.
- Chia, J. K., and McManus, E. J. (1990). *In vitro* tumor necrosis factor induction assay for analysis of febrile toxicity associated with amphotericin B preparations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34, 906–908.
- Choi, J. H., Kwon, E. Y., Park, C. M., Choi, S. M., Lee, D. G., Yoo, J. H., Shin, W. S., and Stevens, D. A. (2010). Immunomodulatory effects of antifungal agents on the response of human monocytic cells to *Aspergillus fumigatus* conidia. *Med. Mycol.* 48, 704–709.
- Cleary, J. D., Chapman, S. W., and Nolan, R. L. (1992). Pharmacologic modulation of interleukin-1 expression by amphotericin B-stimulated human mononuclear cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36, 977–981.
- Cohen, B. E. (1992). A sequential mechanism for the formation of aqueous channels by amphotericin B in liposomes. The effect of sterols and phospholipid composition. *Biochim. Biophys. Acta* 1108, 49–58.
- Cohen, B. E. (2010). Amphotericin B membrane action: role for two types of ion channels in eliciting cell survival and lethal effects. *J. Membr. Biol.* 238, 1–20.
- Cohen, B. E., Benaim, G., Ruiz, M. C., and Michelangeli, F. (1990). Increased calcium permeability is not responsible for the rapid lethal effects of amphotericin B on *Leishmania* sp. *FEBS Lett.* 259, 286–288.
- Cohen, B. E., and Gamargo, M. (1987). Concentration and time dependence of amphotericin B-induced permeability changes across plasma membrane vesicles from *Leishmania* sp. *Drugs. Exp. Clin. Res.* 13, 539–546.
- Coste, A., Linas, M. D., Cassaing, S., Bernad, J., Chalmeton, S., Seguela, J. P., and Pipry, B. (2002). A sub-inhibitory concentration of amphotericin B enhances candidastatic activity of interferon- γ - and interleukin-13-treated murine peritoneal macrophages. *J. Antimicrob. Chemother.* 49, 731–740.
- Cuenca-Estrella, M., Ruiz-Diez, B., Martinez-Suarez, J. V., Monzon, A., and Rodriguez-Tudela, J. L. (1999). Comparative *in-vitro* activity of voriconazole (UK-109,496) and six other antifungal agents against clinical isolates of *Scedosporium proliferans* and *Scedosporium apiospermum*. *J. Antimicrob. Chemother.* 43, 149–151.
- Currie, B., Sanati, H., Ibrahim, A. S., Edwards, J. E. Jr., Casadevall, A., and Ghannoum, M. A. (1995). Sterol compositions and susceptibilities to amphotericin B of environmental *Cryptococcus neoformans* isolates are changed by murine passage. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 1934–1937.
- Dannaoui, E., Borel, E., Persat, F., Piens, M. A., and Picot, S. (2000). Amphotericin B resistance of *Aspergillus terreus* in a murine model of disseminated aspergillosis. *J. Med. Microbiol.* 49, 601–606.
- Davis, L. E., and Porter, B. S. (2005). Central nervous system coccidioides immitis infections. *Curr. Treat. Options Neurol.* 7, 157–165.
- Drutz, D. J., and Lehrer, R. I. (1978). Development of amphotericin B-resistant *Candida tropicalis* in a patient with defective leukocyte function. *Am. J. Med. Sci.* 276, 77–92.
- Dupont, B. (2002). Overview of the lipid formulations of amphotericin B. *J. Antimicrob. Chemother.* 49(Suppl. 1), 31–36.
- Ellis, D. (2002). Amphotericin B: spectrum and resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 49(Suppl. 1), 7–10.
- Falk, R., Hacham, M., Nyska, A., Foley, J. F., Domb, A. J., and Polacheck, I. (2005). Induction of interleukin-1 β , tumor necrosis factor- α and apoptosis in mouse organs by amphotericin B is neutralized by conjugation with arabinogalactan. *J. Antimicrob. Chemother.* 55, 713–720.
- Finkelstein, A., and Holz, R. (1973). Aqueous pores created in thin lipid membranes by the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B. *Membranes* 2, 377–408.
- Gale, E. F. (1974). The release of potassium ions from *Candida albicans* in the presence of polyene antibiotics. *J. Gen. Microbiol.* 80, 451–465.
- Gale, E. F., Johnson, A. M., and Kerridge, D. (1977). The effect of aeration and metabolic inhibitors on resistance to amphotericin in starved cultures of *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.* 99, 77–84.
- Gale, E. F., Johnson, A. M., Kerridge, D., and Koh, T. Y. (1975). Factors affecting the changes in amphotericin sensitivity of *Candida albicans* during growth. *J. Gen. Microbiol.* 87, 20–36.
- Geraghty, P., and Kavanagh, K. (2003). Disruption of mitochondrial function in *Candida albicans* leads to reduced cellular ergosterol levels and elevated growth in the presence of amphotericin B. *Arch. Microbiol.* 179, 295–300.
- Ghannoum, M. A., and Rice, L. B. (1999). Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 501–517.
- Gomez-Lopez, A., Zaragoza, O., Rodriguez-Tudela, J. L., and Cuenca-Estrella, M. (2008). Pharmacotherapy of yeast infections. *Expert Opin. Pharmacother.* 9, 2801–2816.
- Gray, K. C., Palacios, D. S., Dailey, I., Endo, M. M., Uno, B. E., Wilcock, B. C., and Burke, M. D. (2012). Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 2234–2239.

- Gulati, M., Bajad, S., Singh, S., Ferdous, A. J., and Singh, M. (1998). Development of liposomal amphotericin B formulation. *J. Microencapsul.* 15, 137–151.
- Haido, R. M., and Barreto-Bergter, E. (1989). Amphotericin B-induced damage of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Chem. Biol. Interact.* 71, 91–103.
- Hartsel, S. C., Benz, S. K., Ayenew, W., and Bolard, J. (1994). Na⁺, K⁺ and Cl⁻ selectivity of the permeability pathways induced through sterol-containing membrane vesicles by amphotericin B and other polyene antibiotics. *Eur. Biophys. J.* 23, 125–132.
- Heese-Peck, A., Pichler, H., Zanolari, B., Watanabe, R., Daum, G., and Riezman, H. (2002). Multiple functions of sterols in yeast endocytosis. *Mol. Biol. Cell* 13, 2664–2680.
- Hsueh, C. C., and Feingold, D. S. (1973). Selective membrane toxicity of the polyene antibiotics: studies on natural membranes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 4, 316–319.
- Janeway, C. J., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M. J. (2005). *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. New York, NY: Garland Sciences.
- Joseph-Horne, T., Loeffler, R. S., Hollomon, D. W., and Kelly, S. L. (1996a). Amphotericin B resistant isolates of *Cryptococcus neoformans* without alteration in sterol biosynthesis. *J. Med. Vet. Mycol.* 34, 223–225.
- Joseph-Horne, T., Manning, N., Holoman, D., and Kelly, S. L. (1996b). Nonsterol related resistance in *Ustilago maydis* to the polyene antifungals, amphotericin B and nystatin. *Phytochemistry* 42, 637–639.
- Kelly, S. L., Lamb, D. C., Kelly, D. E., Loeffler, J., and Einsele, H. (1996). Resistance to fluconazole and amphotericin B in *Candida albicans* from AIDS patients. *Lancet* 348, 1523–1524.
- Kelly, S. L., Lamb, D. C., Kelly, D. E., Manning, N. J., Loeffler, J., Hebart, H., Schumacher, U., and Einsele, H. (1997). Resistance to fluconazole and cross-resistance to amphotericin B in *Candida albicans* from AIDS patients caused by defective sterol delta 5, 6-desaturation. *FEBS Lett.* 400, 80–82.
- Kelly, S. L., Lamb, D. C., Taylor, M., Corran, A. J., Baldwin, B. C., and Powderly, W. G. (1994). Resistance to amphotericin B associated with defective sterol delta 8→7 isomerase in a *Cryptococcus neoformans* strain from an AIDS patient. *FEMS Microbiol. Lett.* 122, 39–42.
- Khan, Z. U., Al-Sweih, N. A., Ahmad, S., Al-Kazemi, N., Khan, S., Joseph, L., and Chandy, R. (2007). Outbreak of fungemia among neonates caused by *Candida haemulonii* resistant to amphotericin B, itraconazole, and fluconazole. *J. Clin. Microbiol.* 45, 2025–2027.
- Khot, P. D., Suci, P. A., Miller, R. L., Nelson, R. D., and Tyler, B. J. (2006). A small subpopulation of blastospores in *Candida albicans* biofilms exhibit resistance to amphotericin B associated with differential regulation of ergosterol and beta-1, 6-glucan pathway genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 3708–3716.
- Kim, S. J., and Kwon-Chung, K. J. (1974). Polyene-resistant mutants of *Aspergillus fennelliae*: sterol content and genetics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 6, 102–113.
- Kim, S. J., Kwon-Chung, K. J., Milne, G. W., and Prescott, B. (1974). Polyene-resistant mutants of *Aspergillus fennelliae*: identification of sterols. *Antimicrob. Agents Chemother.* 6, 405–410.
- Kinsky, S. C. (1970). Antibiotic interaction with model membranes. *Annu. Rev. Pharmacol.* 10, 119–142.
- Kreiner, V. G., Vybornykh, S. N., Baranova, N. A., and Egorov, N. S. (1993). The effect of lovastatin on sterol synthesis and yeast resistance to polyene antibiotics. *Antibiot. Khimioter.* 38, 16–19.
- Lamy-Freund, M. T., Ferreira, V. F., and Schreier, S. (1985). Mechanism of inactivation of the polyene antibiotic amphotericin B. Evidence for radical formation in the process of autooxidation. *J. Antibiot. (Tokyo)* 38, 753–757.
- Laniado-Laborin, R., and Cabrales-Vargas, M. N. (2009). Amphotericin B: side effects and toxicity. *Rev. Iberoam. Micol.* 26, 223–227.
- Lin, Z. Y., Chuang, W. L., and Chuang, Y. H. (2009). Amphotericin B up-regulates angiogenic genes in hepatocellular carcinoma cell lines. *Eur. J. Clin. Invest.* 39, 239–245.
- Liu, T. T., Lee, R. E., Barker, K. S., Wei, L., Homayouni, R., and Rogers, P. D. (2005). Genome-wide expression profiling of the response to azole, polyene, echinocandin, and pyrimidine antifungal agents in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 2226–2236.
- Lopez-Berestein, G., Fainstein, V., Hopfer, R., Mehta, K., Sullivan, M. P., Keating, M., Rosenblum, M. G., Mehta, R., Luna, M., Hersh, E. M., Reuben, J., Juliano, R. L., and Bodey, G. P. (1985). Liposomal amphotericin B for the treatment of systemic fungal infections in patients with cancer: a preliminary study. *J. Infect. Dis.* 151, 704–710.
- Louie, A., Baltch, A. L., Franke, M. A., Smith, R. P., and Gordon, M. A. (1994). Comparative capacity of four antifungal agents to stimulate murine macrophages to produce tumour necrosis factor alpha: an effect that is attenuated by pentoxifylline, liposomal vesicles, and dexamethasone. *J. Antimicrob. Chemother.* 34, 975–987.
- Louie, A., Baltch, A. L., Smith, R. P., Franke, M. A., Ritz, W. J., Singh, J. K., and Gordon, M. A. (1995). Fluconazole and amphotericin B antifungal therapies do not negate the protective effect of endogenous tumor necrosis factor in a murine model of fatal disseminated candidiasis. *J. Infect. Dis.* 171, 406–415.
- Merz, W. G., and Sandford, G. R. (1979). Isolation and characterization of a polyene-resistant variant of *Candida tropicalis*. *J. Clin. Microbiol.* 9, 677–680.
- Metcalf, S. C., and Dockrell, D. H. (2007). Improved outcomes associated with advances in therapy for invasive fungal infections in immunocompromised hosts. *J. Infect.* 55, 287–299.
- Meunier, F., Prentice, H. G., and Ringden, O. (1991). Liposomal amphotericin B (AmBisome): safety data from a phase II/III clinical trial. *J. Antimicrob. Chemother.* 28(Suppl. B), 83–91.
- Mone, Y., Mitta, G., Duval, D., and Gourbal, B. E. (2010). Effect of amphotericin B on the infection success of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. *Exp. Parasitol.* 125, 70–75.
- Mouri, R., Konoki, K., Matsumori, N., Oishi, T., and Murata, M. (2008). Complex formation of amphotericin B in sterol-containing membranes as evidenced by surface plasmon resonance. *Biochemistry* 47, 7807–7815.
- Mousavi, S. A., and Robson, G. D. (2004). Oxidative and amphotericin B-mediated cell death in the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus* is associated with an apoptotic-like phenotype. *Microbiology* 150, 1937–1945.
- Mowat, E., Lang, S., Williams, C., McCulloch, E., Jones, B., and Ramage, G. (2008). Phase-dependent antifungal activity against *Aspergillus fumigatus* developing multicellular filamentous biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* 62, 1281–1284.
- Mozaffarian, N., Berman, J. W., and Casadevall, A. (1997). Enhancement of nitric oxide synthesis by macrophages represents an additional mechanism of action for amphotericin B. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 1825–1829.
- Muhammed, M., Coleman, J. J., Carneiro, H. A., and Mylonakis, E. (2011). The challenge of managing fusariosis. *Virulence* 2, 91–96.
- Nolte, F. S., Parkinson, T., Falconer, D. J., Dix, S., Williams, J., Gilmore, C., Geller, R., and Wingard, J. R. (1997). Isolation and characterization of fluconazole- and amphotericin B-resistant *Candida albicans* from blood of two patients with leukemia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 196–199.
- Osaka, K., Ritov, V. B., Bernardo, J. F., Branch, R. A., and Kagan, V. E. (1997). Amphotericin B protects cis-parinaric acid against peroxyl radical-induced oxidation: amphotericin B as an antioxidant. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 743–747.
- Oura, M., Sternberg, T. H., and Wright, E. T. (1955). A new antifungal antibiotic, amphotericin B. *Antibiot. Annu.* 3, 566–573.
- Paila, Y. D., Saha, B., and Chattopadhyay, A. (2010). Amphotericin B inhibits entry of *Leishmania donovani* into primary macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 399, 429–433.
- Palacios, D. S., Anderson, T. M., and Burke, M. D. (2007). A post-PKS oxidation of the amphotericin B skeleton predicted to be critical for channel formation is not required for potent antifungal activity. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 13804–13805.
- Palacios, D. S., Dailey, I., Siebert, D. M., Wilcock, B. C., and Burke, M. D. (2011). Synthesis-enabled functional group deletions reveal key underpinnings of amphotericin B ion channel and antifungal activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 6733–6738.
- Phillips, A. J., Sudbery, I., and Ramsdale, M. (2003). Apoptosis induced by environmental stresses and amphotericin B in *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 14327–14332.
- Pleskoff, O., Seman, M., and Alizon, M. (1995). Amphotericin B derivative blocks human immunodeficiency virus type 1 entry after CD4 binding: effect on virus-cell fusion but not on cell-cell fusion. *J. Virol.* 69, 570–574.
- Powderly, W. G., Kobayashi, G. S., Herzig, G. P., and Medoff, G. (1988). Amphotericin B-resistant

- yeast infection in severely immunocompromised patients. *Am. J. Med.* 84, 826–832.
- Puccetti, P., Romani, L., and Bistoni, F. (1995). A TH1-TH2-like switch in candidiasis: new perspectives for therapy. *Trends Microbiol.* 3, 237–240.
- Ramos, H., Attias De Murciano, A., Cohen, B. E., and Bolard, J. (1989). The polyene antibiotic amphotericin B acts as a Ca²⁺ ionophore in sterol-containing liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* 982, 303–306.
- Ramos, H., Valdivieso, E., Gamargo, M., Dagger, F., and Cohen, B. E. (1996). Amphotericin B kills unicellular leishmanias by forming aqueous pores permeable to small cations and anions. *J. Membr. Biol.* 152, 65–75.
- Reuter, S., Merkle, M., Brehm, K., Kern, P., and Manfras, B. (2003). Effect of amphotericin B on larval growth of *Echinococcus multilocularis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 620–625.
- Ringden, O., Meunier, F., Tollemar, J., Ricci, P., Tura, S., Kuse, E., Viviani, M. A., Gorin, N. C., Klastersky, J., Fenaux, P., Prentice, H. G., and Ksionski, G. (1991). Efficacy of amphotericin B encapsulated in liposomes (AmBisome) in the treatment of invasive fungal infections in immunocompromised patients. *J. Antimicrob. Chemother.* 28(Suppl. B), 73–82.
- Rogasi, P. G., Zanazzi, M., Nocentini, J., Fantoni, E., Trotta, M., Faggi, E., Fontanelli, A., Bertoni, E., Salvadori, M., and Leoncini, F. (2007). Disseminated *Scedosporium apiospermum* infection in renal transplant recipient: long-term successful treatment with voriconazole: a case report. *Transplant. Proc.* 39, 2033–2035.
- Rogers, P. D., Stiles, J. K., Chapman, S. W., and Cleary, J. D. (2000). Amphotericin B induces expression of genes encoding chemokines and cell adhesion molecules in the human monocytic cell line THP-1. *J. Infect. Dis.* 182, 1280–1283.
- Roilides, E., Lyman, C. A., Filioti, J., Akpogheneta, O., Sein, T., Lamaignere, C. G., Petratiene, R., and Walsh, T. J. (2002). Amphotericin B formulations exert additive antifungal activity in combination with pulmonary alveolar macrophages and polymorphonuclear leukocytes against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 1974–1976.
- Romani, L., and Howard, D. H. (1995). Mechanisms of resistance to fungal infections. *Curr. Opin. Immunol.* 7, 517–523.
- Romero, E. A., Valdivieso, E., and Cohen, B. E. (2009). Formation of two different types of ion channels by amphotericin B in human erythrocyte membranes. *J. Membr. Biol.* 230, 69–81.
- Rust, D. M., and Jameson, G. (1998). The novel lipid delivery system of amphotericin B: drug profile and relevance to clinical practice. *Oncol. Nurs. Forum* 25, 35–48.
- Saag, M. S., Graybill, R. J., Larsen, R. A., Pappas, P. G., Perfect, J. R., Powderly, W. G., Sobel, J. D., and Dismukes, W. E. (2000). Practice guidelines for the management of cryptococcal disease. Infectious diseases society of america. *Clin. Infect. Dis.* 30, 710–718.
- Sabra, R., and Branch, R. A. (1990). Amphotericin B nephrotoxicity. *Drug Saf.* 5, 94–108.
- Safe, L. M., Safe, S. H., Subden, R. E., and Morris, D. C. (1977). Sterol content and polyene antibiotic resistance in isolates of *Candida krusei*, *Candida parakrusei*, and *Candida tropicalis*. *Can. J. Microbiol.* 23, 398–401.
- Saliba, F., and Dupont, B. (2008). Renal impairment and amphotericin B formulations in patients with invasive fungal infections. *Med. Mycol.* 46, 97–112.
- Sangalli-Leite, F., Scorzoni, L., Mesa-Arango, A. C., Casas, C., Herrero, E., Gianinni, M. J., Rodriguez-Tudela, J. L., Cuenca-Estrella, M., and Zaragoza, O. (2011). Amphotericin B mediates killing in *Cryptococcus neoformans* through the induction of a strong oxidative burst. *Microbes Infect.* 13, 457–467.
- Sanglard, D., Ischer, F., Parkinson, T., Falconer, D., and Bille, J. (2003). *Candida albicans* mutations in the ergosterol biosynthetic pathway and resistance to several antifungal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 2404–2412.
- Sau, K., Mambula, S. S., Latz, E., Henneke, P., Golenbock, D. T., and Levitz, S. M. (2003). The antifungal drug amphotericin B promotes inflammatory cytokine release by a Toll-like receptor- and CD14-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* 278, 37561–37568.
- Saxena, S., Bhatnagar, P. K., Ghosh, P. C., and Sarma, P. U. (1999). Effect of amphotericin B lipid formulation on immune response in aspergillosis. *Int. J. Pharm.* 188, 19–30.
- Sculier, J. P., and Body, J. J. (1991). Intravenous administration of amphotericin B entrapped in liposomes: induction of high serum levels of TNF alpha. *Ann. Oncol.* 2, 141–144.
- Shadkchan, Y., Keisari, Y., and Segal, E. (2004). Cytokines in mice treated with amphotericin B-intralipid. *Med. Mycol.* 42, 123–128.
- Sharma, M., Manoharlal, R., Negi, A. S., and Prasad, R. (2010). Synergistic anticandidal activity of pure polyphenol curcumin I in combination with azoles and polyenes generates reactive oxygen species leading to apoptosis. *FEMS Yeast Res.* 10, 570–578.
- Shoham, S., Huang, C., Chen, J. M., Golenbock, D. T., and Levitz, S. M. (2001). Toll-like receptor 4 mediates intracellular signaling without TNF-alpha release in response to *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule. *J. Immunol.* 166, 4620–4626.
- Simitsopoulou, M., and Roilides, E. (2005). Evaluation of immunotherapy in invasive candidiasis: antifungal activity and cytokine expression assays. *Methods Mol. Med.* 118, 161–179.
- Simitsopoulou, M., Roilides, E., Dotis, J., Dalakiouridou, M., Dudkova, E., Andreadou, E., and Walsh, T. J. (2005). Differential expression of cytokines and chemokines in human monocytes induced by lipid formulations of amphotericin B. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 1397–1403.
- Sokol-Anderson, M., Sligh, J. E. Jr., Elberg, S., Brajtburg, J., Kobayashi, G. S., and Medoff, G. (1988). Role of cell defense against oxidative damage in the resistance of *Candida albicans* to the killing effect of amphotericin B. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32, 702–705.
- Sokol-Anderson, M. L., Brajtburg, J., and Medoff, G. (1986). Amphotericin B-induced oxidative damage and killing of *Candida albicans*. *J. Infect. Dis.* 154, 76–83.
- Sud, I. J., and Feingold, D. S. (1983). Effect of ketoconazole on the fungicidal action of amphotericin B in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 23, 185–187.
- Sullivan, G. W., Carper, H. T., and Mandell, G. L. (1992). Lipid complexing decreases amphotericin B inflammatory activation of human neutrophils compared with that of a desoxycholate-suspended preparation of amphotericin B (Fungizone). *Antimicrob. Agents Chemother.* 36, 39–45.
- Suschek, C. V., Bonmann, E., Kapsokafalou, A., Hemmrich, K., Kleinert, H., Forstermann, U., Kroncke, K. D., Mahotka, C., and Kolb-Bachofen, V. (2002). Revisiting an old antimicrobial drug: amphotericin B induces interleukin-1-converting enzyme as the main factor for inducible nitric-oxide synthase expression in activated endothelia. *Mol. Pharmacol.* 62, 936–946.
- Suschek, C. V., Bonmann, E., Kleinert, H., Wenzel, M., Mahotka, C., Kolb, H., Forstermann, U., Gerharz, C. D., and Kolb-Bachofen, V. (2000). Amphotericin B severely affects expression and activity of the endothelial constitutive nitric oxide synthase involving altered mRNA stability. *Br. J. Pharmacol.* 131, 473–481.
- Sutton, D. A., Sanche, S. E., Revankar, S. G., Fothergill, A. W., and Rinaldi, M. G. (1999). *In vitro* amphotericin B resistance in clinical isolates of *Aspergillus terreus*, with a head-to-head comparison to voriconazole. *J. Clin. Microbiol.* 37, 2343–2345.
- Te Welscher, Y. M., Jones, L., Van Leeuwen, M. R., Dijksterhuis, J., De Kruijff, B., Eitzen, G., and Breukink, E. (2010). Natamycin inhibits vacuole fusion at the priming phase via a specific interaction with ergosterol. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 2618–2625.
- Tohyama, M., Kawakami, K., and Saito, A. (1996). Anticryptococcal effect of amphotericin B is mediated through macrophage production of nitric oxide. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40, 1919–1923.
- Torrado, J. J., Espada, R., Ballesteros, M. P., and Torrado-Santiago, S. (2008). Amphotericin B formulations and drug targeting. *J. Pharm. Sci.* 97, 2405–2425.
- Trajkovic, V., Markovic, M., Samardzic, T., Miljkovic, D. J., Popadic, D., and Mostarica Stojkovic, M. (2001). Amphotericin B potentiates the activation of inducible nitric oxide synthase and causes nitric oxide-dependent mitochondrial dysfunction in cytokine-treated rodent astrocytes. *Glia* 35, 180–188.
- Trejo, W. H., and Bennett, R. E. (1963). *Streptomyces nodosus* sp. n., the amphotericin-producing organism. *J. Bacteriol.* 85, 436–439.
- Turtinen, L. W., Prall, D. N., Bremer, L. A., Nauss, R. E., and Hartsel, S. C. (2004). Antibody array-generated profiles of cytokine release from THP-1 leukemic monocytes exposed to different amphotericin B formulations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 396–403.
- Vandeputte, P., Tronchin, G., Berges, T., Hennequin, C., Chabasse, D., and Bouchara, J. P. (2007). Reduced susceptibility to polyenes associated with a missense mutation in

- the ERG6 gene in a clinical isolate of *Candida glabrata* with pseudohyphal growth. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 982–990.
- Vazquez, J. A., Arganoza, M. T., Boikov, D., Yoon, S., Sobel, J. D., and Akins, R. A. (1998). Stable phenotypic resistance of *Candida* species to amphotericin B conferred by preexposure to subinhibitory levels of azoles. *J. Clin. Microbiol.* 36, 2690–2695.
- Veerareddy, P. R., and Vobalaboina, V. (2004). Lipid-based formulations of amphotericin B. *Drugs Today (Barc)* 40, 133–145.
- Walsh, T. J., Hiemenz, J. W., Seibel, N. L., Perfect, J. R., Horwith, G., Lee, L., Silber, J. L., Dinubile, M. J., Rebol, A., Bow, E., Lister, J., and Anaissie, E. J. (1998). Amphotericin B lipid complex for invasive fungal infections: analysis of safety and efficacy in 556 cases. *Clin. Infect. Dis.* 26, 1383–1396.
- Walsh, T. J., Petraitis, V., Petraitiene, R., Field-Ridley, A., Sutton, D., Ghannoum, M., Sein, T., Schaefele, R., Peter, J., Bacher, J., Casler, H., Armstrong, D., Espinel-Ingroff, A., Rinaldi, M. G., and Lyman, C. A. (2003). Experimental pulmonary aspergillosis due to *Aspergillus terreus*: pathogenesis and treatment of an emerging fungal pathogen resistant to amphotericin B. *J. Infect. Dis.* 188, 305–319.
- Waness, A., Dawsari, G. A., and Jahdali, H. A. (2009). The rise of an opportunistic infection called “Invasive Zygomycosis”. *J. Glob. Infect. Dis.* 1, 131–138.
- Wilson, E., Thorson, L., and Speert, D. P. (1991). Enhancement of macrophage superoxide anion production by amphotericin B. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35, 796–800.
- Wolf, J. E., and Massof, S. E. (1990). *In vivo* activation of macrophage oxidative burst activity by cytokines and amphotericin B. *Infect. Immun.* 58, 1296–1300.
- Woods, R. A., Bard, M., Jackson, I. E., and Drutz, D. J. (1974). Resistance to polyene antibiotics and correlated sterol changes in two isolates of *Candida tropicalis* from a patient with an amphotericin B-resistant funguria. *J. Infect. Dis.* 129, 53–58.
- Yano, T., Itoh, Y., Kawamura, E., Maeda, A., Egashira, N., Nishida, M., Kurose, H., and Oishi, R. (2009). Amphotericin B-induced renal tubular cell injury is mediated by Na⁺ Influx through ion-permeable pores and subsequent activation of mitogen-activated protein kinases and elevation of intracellular Ca²⁺ concentration. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 1420–1426.
- Yardley, V., and Croft, S. L. (1999). *In vitro* and *in vivo* activity of amphotericin B-lipid formulations against experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61, 193–197.
- Zhang, Y. Q., Gamarra, S., Garcia-Effron, G., Park, S., Perlin, D. S., and Rao, R. (2010). Requirement for ergosterol in V-ATPase function underlies antifungal activity of azole drugs. *PLoS Pathog.* 6:e1000939. doi: 10.1371/journal.ppat.1000939

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 07 May 2012; paper pending published: 28 May 2012; accepted: 21 July 2012; published online: 08 August 2012.

Citation: Mesa-Arango AC, Scorzoni L and Zaragoza O (2012) It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. *Front. Microbio.* 3:286. doi: 10.3389/fmicb.2012.00286

This article was submitted to *Frontiers in Fungi and Their Interactions*, a specialty of *Frontiers in Microbiology*.

Copyright © 2012 Mesa-Arango, Scorzoni and Zaragoza. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in other forums, provided the original authors and source are credited and subject to any copyright notices concerning any third-party graphics etc.

Candida tropicalis Antifungal Cross-Resistance Is Related to Different Azole Target (Erg11p) Modifications

A. Forastiero, A. C. Mesa-Arango, A. Alastruey-Izquierdo, L. Alcazar-Fuoli, L. Bernal-Martinez, T. Pelaez, J. F. Lopez, J. O. Grimalt, A. Gomez-Lopez, I. Cuesta, O. Zaragoza and E. Mellado

Antimicrob. Agents Chemother. 2013, 57(10):4769. DOI: 10.1128/AAC.00477-13.

Published Ahead of Print 22 July 2013.

Updated information and services can be found at:
<http://aac.asm.org/content/57/10/4769>

SUPPLEMENTAL MATERIAL	<i>These include:</i>
	Supplemental material
REFERENCES	This article cites 73 articles, 41 of which can be accessed free at: http://aac.asm.org/content/57/10/4769#ref-list-1
CONTENT ALERTS	Receive: RSS Feeds, eTOCs, free email alerts (when new articles cite this article), more»

Information about commercial reprint orders: <http://journals.asm.org/site/misc/reprints.xhtml>
To subscribe to to another ASM Journal go to: <http://journals.asm.org/site/subscriptions/>

Candida tropicalis Antifungal Cross-Resistance Is Related to Different Azole Target (Erg11p) Modifications

A. Forastiero,^{a,*} A. C. Mesa-Arango,^{a,b} A. Alastruey-Izquierdo,^a L. Alcazar-Fuoli,^a L. Bernal-Martinez,^a T. Pelaez,^c J. F. Lopez,^d J. O. Grimalt,^d A. Gomez-Lopez,^a I. Cuesta,^e O. Zaragoza,^a E. Mellado^a

Mycology Reference Laboratory, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain^a; Group of Investigative Dermatology, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia^b; Microbiology and Infectious Diseases Department, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, and Department of Medicine, Faculty of Medicine, Universidad Complutense, Madrid, Spain^c; Departamento de Química Ambiental, Institute of Environmental Assessment and Water Research (ID/EA), Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Barcelona, Spain^d; Bioinformatic Unit, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain^e

Candida tropicalis ranks between third and fourth among *Candida* species most commonly isolated from clinical specimens. Invasive candidiasis and candidemia are treated with amphotericin B or echinocandins as first-line therapy, with extended-spectrum triazoles as acceptable alternatives. *Candida tropicalis* is usually susceptible to all antifungal agents, although several azole drug-resistant clinical isolates are being reported. However, *C. tropicalis* resistant to amphotericin B is uncommon, and only a few strains have reliably demonstrated a high level of resistance to this agent. The resistance mechanisms operating in *C. tropicalis* strains isolated from clinical samples showing resistance to azole drugs alone or with amphotericin B cross-resistance were elucidated. Antifungal drug resistance was related to mutations of the azole target (Erg11p) with or without alterations of the ergosterol biosynthesis pathway. The antifungal drug resistance shown *in vitro* correlated very well with the results obtained *in vivo* using the model host *Galleria mellonella*. Using this panel of strains, the *G. mellonella* model system was validated as a simple, nonmammalian minihost model that can be used to study *in vitro-in vivo* correlation of antifungals in *C. tropicalis*. The development in *C. tropicalis* of antifungal drug resistance with different mechanisms during antifungal treatment has potential clinical impact and deserves specific prospective studies.

In recent years, an epidemiological change among fungal infections has been observed. Although *Candida albicans* is still the most common species isolated from patients infected with pathogenic yeasts, the frequency of isolation of non-*albicans* *Candida* species has increased (1, 2). The frequency of isolates of non-*albicans* *Candida* species differs with geographical location. *Candida tropicalis* ranks between third and fourth among the species most commonly isolated (3, 4), although it is considered the most frequently isolated species in the Asia-Pacific region (5–7) and the second most frequently isolated species in Brazil and Latin America (20.9% and 13.2%, respectively) (1, 8). Moreover, *C. tropicalis* is almost always associated with the development of fungal infections, and it is often related to higher mortality than other non-*albicans* *Candida* species and *C. albicans*, particularly in neutropenic and oncology patients (2, 9, 10).

Invasive candidiasis and candidemia are treated with amphotericin B or an echinocandin as first-line therapy, with extended-spectrum triazoles as acceptable alternatives (11, 12). *Candida tropicalis* is usually susceptible to all antifungal agents, although several cases of fluconazole and azole cross-resistance in clinical isolates have been reported (5, 13, 14), especially in the Asia-Pacific region (1, 15). On the other hand, *C. tropicalis* resistance to amphotericin B is rare, and very few strains have reliably demonstrated high-level resistance to this agent (16, 17).

Limited specific information is available about the molecular mechanisms of resistance to azoles in *C. tropicalis*, although they are likely to be similar to those identified in other *Candida* species. To date, *Candida* sp. azole resistance has been linked to different molecular mechanisms. (i) Mutations in the azole target, 14 α -sterol demethylase (Erg11p), result in a reduction or loss of affinity with azoles or an incapacity to bind azoles. Also, *ERG11* over-

expression seems to play a role in resistance. (ii) The upregulation of multidrug efflux transporters (ABC [ATP-binding cassette]/MFS [major facilitator superfamily]) leads to decreased drug concentrations within the fungal cell. (iii) A bypass in the ergosterol biosynthesis pathway may develop as a result of mutations in sterol Δ 5,6-desaturase (*ERG3*) (18–20). In *C. albicans*, the most frequent azole resistance mechanisms reported are increased efflux of the drug (85%) and mutations in the *ERG11* sequence (65%) (21). In fact, numerous Erg11p mutations have been described, but only a few have been directly associated with azole resistance (22). Also, the role of amino acid substitutions has been elucidated by heterologous expression of the *ERG11* gene (23, 24). In addition, increasing evidence points to a relationship between amino acid substitutions and changes in protein conformation involved in azole resistance (25, 26). For *C. tropicalis*, overexpression of *C. tropicalis* *ERG11* (CtERG11) associated with missense mutations (Y132F or S154F) has been described as the azole resistance mechanism in clinical isolates (14, 27). Additionally, *in vitro* develop-

Received 8 March 2013 Returned for modification 16 April 2013

Accepted 12 July 2013

Published ahead of print 22 July 2013

Address correspondence to Emilia Mellado, emellado@isci.es.

* Present address: A. Forastiero, Laboratorio de Micología, Hospital Británico, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00477-13>.

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AAC.00477-13

ment of fluconazole resistance in *C. tropicalis* linked to the up-regulation of two multidrug efflux transporter genes, *CtMDR1* and *CtCDR1*, has been reported (28).

In general, adequate measurement of *in vitro* antifungal activity in terms of MICs is considered of clinical relevance and often gives useful therapeutic information for patient management. The correlation between *in vitro* and *in vivo* data can be explored using different experimental models. A mouse model of systemic candidiasis has been used to evaluate the effects of azole resistance mechanisms on the efficacy of azole treatment (29, 30). Murine models are still considered the gold standard for the measurement of *in vivo* drug efficacy but have as a main disadvantage that a large number of animals are needed to determine the dose-response relationships of the antifungal. Increasing concern about the use of mammals, i.e., the cost, the number used, and ethical issues related to the pain of the animals during the procedures, has promoted the use of alternative, nonmammalian invertebrate models for testing microbial virulence and for screening the efficacy of antimicrobial agents. Among these, *Galleria mellonella* presents certain benefits in comparison with other nonmammalian models of infection (31). Previous studies have documented that *G. mellonella* is a valid model for the evaluation of microbial virulence and/or the efficacies of different antimicrobial agents against infections caused by different bacteria and fungi (32–38).

In this work, we investigated the resistance mechanisms operating in *C. tropicalis* strains showing azole cross-resistance alone or combined with amphotericin B resistance. We also tested the *in vivo* antifungal responses of *C. tropicalis* strains, both susceptible and resistant to amphotericin B, fluconazole, and voriconazole, in the model host *G. mellonella* in order to correlate the susceptibility phenotypes of those strains with those shown *in vitro*.

MATERIALS AND METHODS

Strains, media, and growth conditions. Four *Candida tropicalis* strains were used in this study: (i) two ATCC strains, ATCC 750 and ATCC 200956, and (ii) two clinical isolates (CL-6835 and TP-13650) recovered from two patients with candidemia who had been treated with antifungal drugs previously (see Table 1). These isolates were identified by morphological features and were confirmed by DNA internal transcribed spacer (ITS) sequencing. Yeast cells were grown overnight in Sabouraud liquid medium (Becton, Dickinson and Company, MD, USA) at 30°C with constant shaking (150 rpm). Cells were harvested by centrifugation and were washed twice with sterile distilled water. Inoculum sizes were adjusted using a hemocytometer chamber. Yeast nitrogen base (YNB) solid medium was used in the metabolic inhibitor assays.

Antifungal drugs. Amphotericin B (AMB) (Sigma-Aldrich Quimica, Madrid, Spain), fluconazole (FLC) (Pfizer SA, Madrid, Spain), voriconazole (VRC) (Pfizer SA), and anidulafungin (ANF) (Merck & Company, Inc., NJ, USA) were used for the determination of MICs and for assessment of their efficacies against *C. tropicalis* infection in the *Galleria mellonella* model. The antifungal doses were calculated by taking into account the therapeutic dose used for humans and the MIC values for the strains studied (11). Stock solutions of voriconazole, fluconazole, amphotericin B, and anidulafungin were first prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO), and then dilutions in water for injection were made to obtain the following concentrations: 400 and 80 µg/ml of voriconazole; 800, 360, and 80 µg/ml of fluconazole; 120 and 80 µg/ml of amphotericin B; and 400 µg/ml of anidulafungin.

Antifungal susceptibility testing. Antifungal susceptibility was determined by broth microdilution (BMD). MICs were determined by following the recommendations of the Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antibiotic Susceptibility

Testing (AFST-EUCAST) (39). For amphotericin B, the breakpoints were defined based on the distribution of MICs for wild-type strains, determined by a EUCAST method (susceptibility breakpoint, ≤ 1.0 µg/ml) (40). For fluconazole, voriconazole, and anidulafungin, breakpoints proposed by the AFST-EUCAST were used to interpret susceptibility results (41).

Metabolic inhibitor susceptibility assays. The susceptibilities of the strains to different classes of metabolic inhibitors were determined by a visual spotting assay on YNB medium with different drug concentrations (42). Strains were grown in Sabouraud liquid medium as described above, and cell concentrations were adjusted for a starting solution containing 10^5 cells per ml. Then 10-fold serial dilutions were carried out, and 5 µl of each dilution was spotted onto agar plates containing either 2 µg/ml amphotericin B, 10 µg/ml brefeldin A (Sigma-Aldrich Quimica SA, Madrid, Spain), 200 µg/ml hygromycin B (Sigma-Aldrich Quimica SA), or 2 µg/ml terbinafine (Novartis, Basel, Switzerland). Drug-free YNB medium was included as a control. The plates were incubated for 48 h at 37°C before reading.

Amplification and sequencing of ergosterol biosynthesis genes. The *ERG11* and *ERG3* genes were PCR amplified and sequenced using a panel of oligonucleotide primers (synthesized by Sigma Genosys, Madrid, Spain) (see Table S1 in the supplemental material). Genomic DNA was extracted using the DNeasy Plant minikit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA) and was used as the template for PCR amplification. Amplification conditions consisted of 5 min of denaturation at 94°C, followed by 30 cycles of 30 s at 94°C for denaturation, 40 s at 50°C for annealing, and 50 s at 72°C for elongation, and by a final elongation step of 10 min at 72°C. PCR products were purified with the High Pure PCR product purification kit (Roche Diagnostics, Madrid, Spain) according to the manufacturer's recommendations. PCR products were semiquantified by agarose gel electrophoresis and were used as the templates for sequencing, which was performed with the Dye Terminator cycle sequencing quick-start kit (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA). The sequencing PCR products were then purified through G50 Sepharose columns (Amersham Biosciences) and, finally, were sequenced on a CEQ8000 DNA analysis system (Beckman Coulter) with the forward and reverse primers used for PCR amplification (see Table S1 in the supplemental material).

The amino acid sequences of the genes encoding putative 14 α -sterol demethylase (*ERG11*) and sterol $\Delta 5,6$ -desaturase (*ERG3*) were deduced from nucleotide sequences and were analyzed using the MegAlign software package (DNASTar, Inc., Lasergene, Madison, WI, USA). The amino acid alignments were derived by CLUSTAL analysis (43).

Sterol analysis. Sterols were extracted from *C. tropicalis* after 18 h of growth in Sabouraud liquid medium at 37°C with shaking (150 rpm), using the protocol described previously (44, 45). Briefly, cells were harvested by centrifugation, washed with sterile water, lyophilized, and weighed to determine the dry weight (in grams) of the fungus. About 150 to 200 mg was used for total-sterol extraction. A 3-ml volume of a 25% alcoholic potassium hydroxide solution (methanol-ethanol, 3:2) was added to the dried pellets and was mixed by vortexing for 1 min. The mixture was incubated at 85°C in a water bath for 1 h. Neutral lipids were extracted twice by addition of a mixture of 1 ml of water and 1.5 ml of hexane, followed by vigorous vortex mixing for 3 min. The upper hexane layer was transferred to a clean glass tube, evaporated, and stored at -20°C until analysis. One hundred micrograms of androstanol (Sigma) was added to the samples as an internal standard for sterol recovery and quantification. Sterols were converted into their trimethylsilyl ethers by reaction with a 1:1 solution of *N,O*-bis-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (85°C, 60 min) in toluene. Neutral lipid fractions were analyzed on a Trace gas chromatograph coupled to a quadrupole mass analyzer (Thermo Fisher Scientific, Manchester, United Kingdom). The GC program and MS operation conditions were the same as those described previously (45, 46). Sterol identification was based on interpretation and comparison of mass spectra and retention time data with previous data (45, 47). The amount of each sterol (in micrograms) relative to the dry weight (in

grams) of the fungus was calculated from three biological replicates analyzed in triplicate by GC-MS. The relative sterol composition was expressed as the ratios of individual sterol concentrations to the total sterol content. The significance of differences in sterol composition ($P < 0.0001$) was determined by a nonparametric Mann-Whitney test.

Homology modeling of Erg11p. Homology models of wild-type *C. tropicalis* Erg11p and mutated sequences containing amino acid substitutions G464D, G464S, Y132H, and Y132F were constructed using the SWISS-MODEL platform (<http://swissmodel.expasy.org>) (48–50). The crystal structure of human lanosterol 14 α -demethylase (HS-CYP51) in complex with ketoconazole, deposited in the Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>) with code 3LD6 (51), was used as the template. The amino acid sequence identity between this template and *C. tropicalis* Erg11p was 39%. The N-terminal region of *C. tropicalis* Erg11p (residues 1 to 50), defined to comprise the membrane-spanning domains, and therefore without counterparts in the template protein, was deleted prior to protein modeling.

Analysis of R6G uptake and efflux. The activity of efflux pumps in azole- and/or amphotericin B-susceptible and -resistant *C. tropicalis* strains (ATCC 200956, ATCC 750, CL-6835, and TP-13650) was evaluated using rhodamine 6G (R6G) according to the protocol previously described by Vandeputte et al. in 2005 (14) and by Maesaki et al. in 1999 (52). Accumulation of R6G was measured by flow cytometry in the FL2 channel (collecting the emission signal at 585 ± 42 nm). A total of 10,000 cells were recorded using a FACSCalibur cytometer (FL2 channel; CellQuest; BD Biosciences), and the fluorescence intensity of R6G-stained cells was determined. Unstained cells were included as a negative control in all cases. Data were processed using FlowJo software (version 7.1.6; TreeStar Inc., Ashland, OR, USA). Experiments were performed at least twice with each strain on different days. Results were expressed as mean fluorescence intensities (MIF) and standard deviations (SD).

Evaluation of antifungal efficacy in *Galleria mellonella* infected with *C. tropicalis*. *Galleria mellonella* caterpillars in the final instar (stage of larval development) (R.J. Mous Live Bait, the Netherlands) were used. Larvae were stored in the dark at 25°C prior to use. Ten caterpillars (body weight, 400 ± 100 mg) were employed per group. *Candida tropicalis* strains were grown in liquid Sabouraud medium as described above. Preliminary experiments were performed with all the strains to define an appropriate range of inoculum concentrations that would cause 80 to 100% mortality at 72 to 96 h postinfection. The inocula were determined by counting in a hemocytometer chamber and were adjusted in phosphate-buffered saline (PBS) to 2×10^8 cells per ml for ATCC 750, CL-6835, and TP-13650 and to 4×10^8 cells per ml for ATCC 200956. Viable counts were performed to confirm the correct size of the inocula.

A 10- μ l Hamilton syringe (Fisher Scientific, Madrid, Spain) was used to infect the larvae by injecting 10 μ l of the inoculum suspension into the hemocoel of each *G. mellonella* through the last left proleg. Within 2 h of the infection, 10 μ l of an antifungal solution (either 400 or 80 μ g/ml voriconazole, 800, 360, or 80 μ g/ml of fluconazole, 120 or 80 μ g/ml of amphotericin B, or 400 μ g/ml of anidulafungin) was injected into a different proleg using the same technique. After antifungal treatment, caterpillars were incubated at 37°C for 7 days. Larva survival was monitored daily, and larvae were considered dead when they did not respond to physical pressure. The following control groups were included: untouched larvae, pierced larvae, larvae receiving PBS, and larvae given toxic doses of antifungals (400 μ g/ml of voriconazole, 800 μ g/ml of fluconazole, 120 μ g/ml of amphotericin B, or 400 μ g/ml of anidulafungin). Each experiment was performed at least three times, and the results are reported as mean values. To simplify some of the figures, the PBS control group results are not presented.

The survival rate of caterpillars was plotted against time, and P values were calculated by the log rank (Mantel-Cox) test using GraphPad Prism, version 5. P values of <0.01 were considered significant.

Nucleotide sequence accession numbers. The full nucleotide sequence of the *ERG11* gene of *C. tropicalis* ATCC 750 was used as the

reference sequence (GenBank accession number M23673). The full nucleotide sequences of the *ERG11* genes of ATCC 750, ATCC 200956, and the two *C. tropicalis* clinical isolates, CL-6835 and TP-13650, and their deduced amino acid sequences have been deposited in the GenBank database under accession numbers KC542323, KC542324, KC542325, and KC542326, respectively. The full nucleotide sequence of the *ERG3* gene (encoding sterol $\Delta 5,6$ -desaturase) of *C. tropicalis* MYA-3404 was used as the reference sequence for *ERG3* (GenBank accession number XM002550136). The full nucleotide sequences of the *ERG3* genes of the four strains used in this study (ATCC 750, ATCC 200956, CL-6835, and TP-13650) have been deposited in the GenBank database under accession numbers KC542319, KC542320, KC542321, and KC542322, respectively.

RESULTS

Antifungal susceptibility testing. The MIC values of fluconazole (FLC), voriconazole (VRC), amphotericin B (AMB), and anidulafungin (ANF) are shown in Table 1. *Candida tropicalis* strain ATCC 750 was susceptible to all the antifungals tested. Isolate TP-13650 was resistant to fluconazole and voriconazole but susceptible to amphotericin B and anidulafungin. Resistance to all antifungal drugs except anidulafungin was observed for strains ATCC 200956 and CL-6835.

Metabolic inhibitor susceptibility assays. The susceptibility of *C. tropicalis* strains to different metabolic inhibitors was used as a screening method to identify those yeasts with alterations in membrane fluidity. *Candida tropicalis* strains with cross-resistance to azole drugs and amphotericin B were more susceptible to metabolic inhibitors (brefeldin A or hygromycin B) and to terbinafine than the wild-type strain or the strain with azole drug resistance only. Changes in membrane fluidity were clearly detectable when brefeldin A was used (see Fig. S2 in the supplemental material). These results suggest that amphotericin B-resistant isolates may have an alteration of the membrane that increases its permeability, and therefore, these compounds could pass through the membrane relatively easily, resulting in the hypersusceptible phenotype observed *in vitro*.

***ERG11* and *ERG3* gene sequence analyses.** (i) ***ERG11* gene sequence.** No changes were observed between the *ERG11* sequence of strain ATCC 750 determined here and that deposited in GenBank (accession number M23673). Comparison of the *ERG11* gene sequence of strain ATCC 200956 with the available corresponding sequence for strain ATCC 750 revealed a deletion of 132 bp that corresponds to the absence of 44 amino acids within the I helix ($\Delta 276$ –319) of the protein (Table 1; see also Fig. S1B in the supplemental material) and an amino acid substitution (D275V) with restoration of the open reading frame. PCR amplification using two primer combinations with one of the oligonucleotides designed within the deleted sequence clearly showed that the deletion had occurred in the two alleles (see Fig. S4 in the supplemental material). Therefore, strain ATCC 200956 was homozygous for the *ERG11* gene deletion. Analysis of the *ERG11* gene sequences of strains CL-6835 and TP-13650 revealed unique missense mutations for each strain corresponding to amino acid substitutions G464D and Y132F, respectively (see Fig. S1C and A in the supplemental material). Silent mutations were also observed in these strains (Table 1).

(ii) ***ERG3* gene sequence.** The full nucleotide sequence of the *ERG3* gene (encoding sterol $\Delta 5,6$ -desaturase) of *C. tropicalis* MYA-3404 was used as a reference sequence for *ERG3* (GenBank accession number XM002550136). Sequencing of the *ERG3* gene showed single missense mutations, C773T and A334G, in the

TABLE 1 Mutations in *ERG11* and *ERG3* genes, corresponding amino acid substitutions, and MICs of antifungal drugs for *Candida tropicalis* isolates

Isolate	Previous treatment ^a	Gene sequence analysis ^b				MIC (μg/ml) ^c			
		14α-Sterol demethylase		Sterol Δ5,6-desaturase					
		<i>ERG11</i> (bp)	Erg11p (aa)	<i>ERG3</i> (bp)	Erg3p (aa)	AMB	FLC	VRC	ANF
ATCC 750	Unknown			G366A	R122R	0.25	0.5	0.03	0.03
ATCC 200956	Unknown	Δ132 bp — ^d	Δ44 aa D275V	C773T	S258F	2	>64	>8	0.03
		G1362A	K454K						
		C1534G	P511A						
		T1554C	I517I						
CL-6835 (clinical)	FLC, AMB, and CAS	T906C	I302I	A334G	S113G	2	>64	>8	0.03
		G1391A	G464D	G366A	R122R				
				T637C	L212L				
TP-13650 (clinical)	FLC, VRC, and TRB	T225C	C75C			0.25	>64	>8	0.03
		G264A	L88L						
		A395T	Y132F						
		T783C	I261I						
		G1362A	K454K						
		T1554C	I517I						

^a CAS, caspofungin; TRB, terbinafine.^b Substitutions in amino acid sequences are shown in boldface.^c Determined by broth microdilution according to the established method of AFST-EUCAST. AMB, amphotericin B; FLC, fluconazole; VRC, voriconazole; ANF, anidulafungin. EUCAST antifungal clinical breakpoints for *C. tropicalis* are as follows: for AMB, ≤1 μg/ml for susceptibility and >1 μg/ml for resistance; for FLC, ≤2 μg/ml for susceptibility and >4 μg/ml for resistance; for VRC, ≤0.12 μg/ml for susceptibility and >0.12 μg/ml for resistance; and for ANF, ≤0.06 μg/ml for susceptibility and >0.06 μg/ml for resistance.^d —, 132-bp deletion, between nucleotides 824 and 945, results in a 44-amino-acid deletion, between aa 276 and 319. The change in the open reading frame is the cause of the D275V amino acid substitution.

ERG3 sequences of ATCC 200956 and CL-6835, respectively, resulting in the S258F and S113G amino acid substitutions. In addition, CL-6835 presented two point mutations in the *ERG3* gene (T637C and G366A) that did not affect the amino acid sequence. Neither ATCC 750 nor isolate TP-13650 presented any missense mutations in the entire *ERG3* gene sequence (Table 1).

Sterol analysis. To investigate the contribution of membrane sterol composition to antifungal drug resistance, the sterol profiles of susceptible and resistant strains were analyzed by gas chromatography (GC)–mass spectrometry (MS). Sterols were classified according to their GC retention times and mass spectra, and a total of 22 sterols were detected (Table 2). The relative sterol composition for each strain is given in Table 2 based on the retention times of the sterols. Ergosterol was found to be the major sterol in strains ATCC 750 and TP-13650. In contrast, no ergosterol was detected in either ATCC 200956 or CL-6835. This absence of ergosterol suggested possible alterations in the sterol contents of these two strains. We then grouped these metabolites according to the presence of the methyl group on carbon atom 14. Figure S3 in the supplemental material shows statistically significant accumulations of C-14-methylated sterols in ATCC 200956 and CL-6835 that were not observed in strains ATCC 750 and TP-13650. C-14-methylated sterols in ATCC 200956 and CL-6835 comprised 14-methyl fecosterol, 14-methylcholesta-8,24-dien-3β-ol, 4,14-dimethylcholesta-8,24-dien-3β-ol, lanosterol, and eburicol.

Analysis of R6G uptake and efflux. Rhodamine 6G (R6G) is a fluorescent substrate of the multidrug transporter superfamily (conferring multidrug resistance [MDR]) that has already been used to demonstrate the activity of these proteins in azole-resistant isolates of *Candida albicans*. In fact, this dye is exported from

cells by the same types of transporters as those used for azoles in yeasts (52). There were no remarkable differences among the R6G uptake/efflux ratios of the different *C. tropicalis* strains, despite their different antifungal drug susceptibility profiles (see Fig. S5 in the supplemental material). Levels of retention of R6G, after washing with PBS and incubation in fresh YPD medium (15 min), were similar for all strains. The percentages of retention of the total R6G quantified initially ranged from 58 to 83%. Some differences in the initial mean fluorescence intensities (MIF) were observed. For strains ATCC 750 and TP-13650, both susceptible to amphotericin B, the MIF were 239 ± 28 and 365 ± 196, respectively. In contrast, for the amphotericin B-resistant strains ATCC 200956 and CL-6835, the intensities of fluorescence were higher (1,881 ± 28 and 949 ± 4, respectively).

Homology modeling of Erg11p. The crystal structure of human lanosterol 14α-demethylase (HS-CYP51) was used to generate a 3-dimensional (3D) homology model of the amino acid sequence of wild-type *C. tropicalis* Erg11p. The heme cofactor was extracted from the HS-CYP51 structure and was merged into the models obtained. Alignment of the two sequences revealed that there were no insertions or deletions in any of the secondary-structure regions of the protein. The fungus-specific insertion in the C-terminal part of the sequence was modeled as a loop and was supported by the ANOLEA prediction (53), which reported negative energy values for most of the residues of this section. Moreover, none of the residues studied in this paper were located within this region of the model; rather, they were located in conserved regions that have been intensively studied, as discussed below. Therefore, models for Erg11p with the G464S or Y132F substitution were generated using the same approach. Modeling of the partially deleted Erg11p from strain ATCC 200956 was not possible because of the lack of sufficient identity with the available

TABLE 2 Sterol compositions of *Candida tropicalis* strains

Compound no.	Sterol		% of total sterols ^a in strain:			
	Systematic name ^b	Common name	ATCC 750	ATCC 200956	CL-6835	TP-13650
1	Squalene		8.54	0.17	1.45	ND
2	24-Methylcholesta-5,7,9(11),22-tetraen-3 β -ol		0.15	ND	ND	ND
3	S28:3		0.08	ND	ND	ND
4	Cholesta-8,24-dien-3 β -ol	Zymosterol	8.97	ND	ND	20.60
5	14-Methylcholesta-8,24-dien-3 β -ol		ND	0.11	0.07	ND
6	24-Methylcholesta-5,7,22-trien-3β-ol	Ergosterol	64.96	ND	ND	60.84
7	24-Methylcholesta-7,22-dien-3 β -ol		0.20	ND	ND	0.51
8	24-Methylcholesta-5,7,22,24(28)-tetraen-3 β -ol		0.81	ND	ND	5.20
9	14,24-Dimethylcholesta-8,24(28)-dien-3 β -ol	14-Methyl fecosterol	ND	61.08	52.67	ND
10	24-Methylcholesta-8,24(28)-dien-3 β -ol	Fecosterol	1.91	ND	ND	2.31
11	4,14-Dimethylcholesta-8,24-dien-3 β -ol		0.12	1.64	0.63	ND
12	4 α -S28:2		ND	ND	ND	0.21
13	24-Methylcholesta-5,7,24(28)-trien-3 β -ol		2.56	ND	ND	3.43
14	24-Methylcholesta-5,7-dien-3 β -ol		4.11	ND	ND	2.23
15	24-Methylcholesta-7,24(28)-dien-3 β -ol	Episterol	4.45	ND	ND	2.06
16	24-Methylcholest-7-en-3 β -ol		ND	ND	ND	0.03
17	4 α ,4 β ,14-Trimethylcholesta-8,24-dien-3 β -ol	Lanosterol	2.32	25.80	27.75	1.83
18	4 α ,24-Dimethylcholesta-8,24(28)-dien-3 β -ol		0.11	ND	ND	ND
19	4 α ,4 β -Dimethylcholesta-8,24(28)-dien-3 β -ol		0.53	ND	ND	0.65
20	4 α ,4 β ,14,24-Tetramethylcholesta-8,24(28)-dien-3 β -ol	Eburicol	0.15	8.68	17.42	0.10
21	4 α ,4 β ,24-Trimethylcholesta-8,24(28)-dien-3 β -ol		0.03	ND	ND	ND
22	Unidentified		ND	2.51	ND	ND

^a ND, not detected.
^b S28:3 and 4 α -S28:2 refer to sterols with 28 carbon atoms and 3 or 2 double bonds, respectively.

crystal structures of proteins that could be useful as templates. Therefore, this model is not shown but is discussed below. Figure 1A shows the positions of the mutations analyzed, both close to the heme group. The different models revealed that the amino

acid substitutions affected the heme environment in different ways. The wild-type strain shows a tyrosine at position 132 (Fig. 1B), which interacts directly with the heme through the hydroxyl group. Two mutations were analyzed for this site, Y132F and

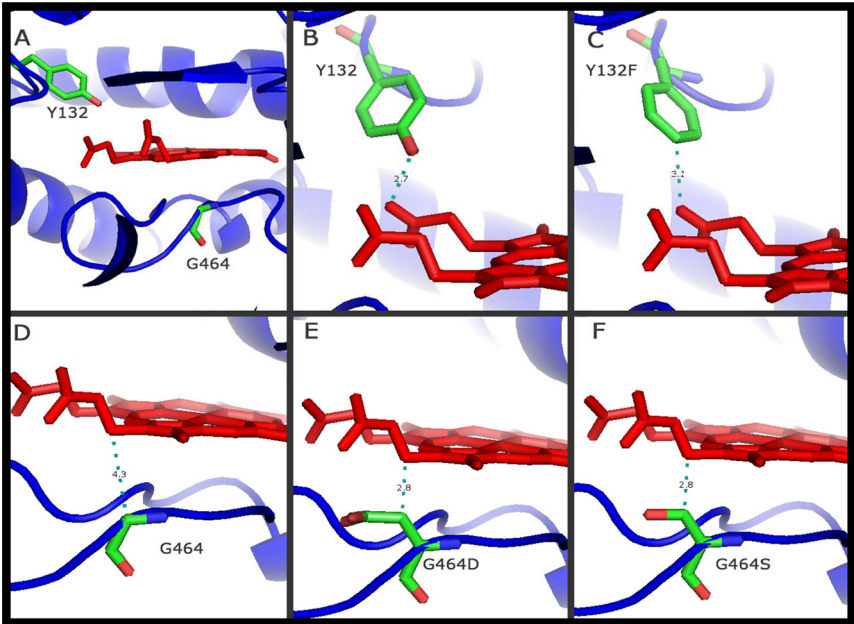


FIG 1 Positions of the point mutations of *Candida tropicalis* Erg11p analyzed according to the homology models generated in this study. (A, B, and D) Wild-type *Candida tropicalis* Erg11p (Y132 and G464). (C, E and F) Positions of the mutations analyzed in the protein: Y132F, G464D, and G464S, respectively. The residues studied are shown in stick representation (green, carbon atoms; red, oxygen atoms; blue, nitrogen atoms). Heme is represented in red. The distance between the heme and the closest atom of the amino acid studied is indicated by a dashed green line and a number giving the distance in daltons. The crystal structure of human lanosterol 14 α -demethylase (HS-CYP51) in complex with ketoconazole (Protein Data Bank code 3LD6) was used as a template. Y, tyrosine; F, phenylalanine; G, glycine; D, aspartic acid; S, serine.

Y132H, but only the former (the one found in this work) is shown. Interaction of the protein with the heme group would be avoided because of the absence in the F residue of the hydroxyl group present in the Y residue, positioned in the 3-Å environment of the heme group (Fig. 1C). Another two mutations were analyzed for the amino acid at position 464. In contrast with Y132, glycine at position 464 (Fig. 1D) is close to the heme group but not within the 3-Å environment and probably does not interact with it. In contrast, the substitution G464S or G464D might affect the environment of the heme group, changing the interaction, due not only to the nucleophilic character of serine (Fig. 1F) or the acidic character of aspartic acid (Fig. 1E) but also to the fact that the side chains of these two amino acids are larger than that of glycine.

***Galleria mellonella* in vivo infection model and antifungal response.** *Galleria mellonella* larvae were infected with an inoculum of 2×10^6 CFU/larva when strain ATCC 750, CL-6835, or TP-13650 was used. An inoculum of 4×10^6 CFU/larva was used for ATCC 200956, since this strain shows reduced virulence in this model (37). In all cases, 80% of infected and untreated larvae died between the 3rd and 4th day postinfection. For each strain inoculated, the survival of the larvae was dependent on both the antifungal dose administered and the *in vitro* MIC (Fig. 2 to 4).

The results showed that at therapeutic doses of azole drugs (10 mg of voriconazole/kg of body weight/day, equivalent to 4 µg/larva, and 9 mg of fluconazole/kg of body weight/day, equivalent to 3.6 µg/larva), larvae infected with azole-susceptible strain ATCC 750 showed significantly improved survival relative to that of their untreated control groups (P , 0.0033 for both VRC and FLC) (Fig. 2). In contrast, when *G. mellonella* larvae were infected with an azole-resistant strain (ATCC 200956, TP-13650, or CL-6835) and treated with a therapeutic (10 mg of voriconazole/kg/day, equivalent to 4 µg/larva, or 9 mg of fluconazole/kg/day, equivalent to 3.6 µg/larva) or subtherapeutic (2 mg/kg/day, equivalent to 0.8 µg/larva) dose of an azole, the percentages of survival of these groups did not differ significantly from those of their respective untreated control groups (Fig. 2). In addition, an increase in the fluconazole dosage to 20 mg/kg/day (equivalent to 8 µg/larva) failed to improve survival when larvae were infected with these strains (Fig. 2).

Amphotericin B treatment (1.2 µg/larva, equivalent to a therapeutic dose of 3 mg/kg/day) improved the survival of larvae infected with strain ATCC 750 (P , 0.0015) or TP-13650 (P , 0.0002) but not that of those infected with a strain (ATCC 200956 or CL-6835) cross-resistant to azole and amphotericin B (Fig. 3).

In contrast, anidulafungin was the most active antifungal drug against all strains regardless of their azole/amphotericin B susceptibility profiles, with a larval survival range between 30 and 50% at the end of the experiment (Fig. 4). None of the drugs were toxic to the larvae at any of the concentrations used (data not shown).

DISCUSSION

Candida tropicalis is usually susceptible to all antifungal agents. However, antifungals have been used extensively for the prophylaxis or treatment of candidiasis, and there are increasing reports of azole resistance for this species (13, 14, 27, 54). In fact, the azole-resistant clinical isolates of *C. tropicalis* studied in this work were recovered from two patients suffering from candidemia and treated with different antifungals (Table 1). The precise mecha-

nisms responsible for azole drug resistance in *Candida* species have been extensively studied and reviewed (18–20, 55). In *Candida albicans*, numerous *ERG11* mutations have been described, but only a few of them have been associated with amino acid substitutions and azole resistance (22). The most frequently reported modifications are the substitutions Y132H, D278E, S405F, G464S, and R467K (14, 22). However, little information is available concerning the molecular mechanisms leading to azole resistance in the pathogenic yeast *C. tropicalis*. Acquired resistance to azole drugs in clinical isolates of *C. tropicalis* due to overexpression of a *CtERG11* gene associated with missense mutations (Y132F and S145F) has been reported (13, 26).

In this study, we intensively investigated the molecular bases for *C. tropicalis* strains presenting a pattern of resistance to azole drugs, alone or in combination with resistance to amphotericin B. Cross-resistance to azoles and amphotericin B drugs was observed in two of the *C. tropicalis* strains analyzed (ATCC 200956 and CL-6835), while strain TP-13650 was resistant only to azole drugs. We also confirmed this *in vitro* phenotype *in vivo* by using an alternative minihost model of candidiasis.

Enhanced drug efflux activation is one of the major mechanisms causing azole resistance in yeast, although it could be accompanied by other resistance mechanisms. This mechanism is a consequence of transcriptional activation of genes encoding drug efflux pump proteins belonging to the ABC (encoded by *Candida* drug resistance [CDR] genes) and major facilitator (encoded by MDR genes) superfamilies of transporters (20). In order to search for concomitant resistance mechanisms related to increased efflux pump activity, we tested this possibility using rhodamine 6G (R6G). This compound is a fluorescent substrate of the multidrug transporter superfamily and has been used to demonstrate the activity of these proteins in azole-resistant isolates of *C. albicans*, because this dye uses the same transporters as azoles in yeasts (52). Our results showed that all strains captured R6G, although amphotericin B-resistant strains showed higher uptake/efflux ratios than amphotericin B-susceptible strains at time zero. This phenomenon could be explained by higher membrane permeability due to changes in the sterol composition of the membrane. However, analysis of the uptake and efflux of R6G for all azole-resistant or wild-type *C. tropicalis* strains shows that the efflux pumps do not seem to play a fundamental role in azole resistance in *C. tropicalis*, in agreement with previous results (14, 27).

The antifungal susceptibility phenotype of strains ATCC 200956 and CL-6835 resembled that of *C. albicans* *ERG11/ERG11* double mutant strains showing resistance to azoles as well as to amphotericin B on either the wild-type or the *ERG3/ERG3* mutant background (42). Also, our data were consistent with those for the *C. albicans* *ERG11*-null mutation when the strains were tested against different metabolic inhibitors (see Fig. S2 in the supplemental material). These data suggest that the susceptibilities of both antifungal cross-resistant *C. tropicalis* strains to these metabolic compounds might be related to changes in the composition and permeability of the fungal membrane and are likely associated with the functionality of Erg11p and alterations in ergosterol biosynthesis (42, 56). Sterol analysis confirmed the absence of ergosterol (Table 2) and the accumulation of 14-methyl sterols in *C. tropicalis* strains ATCC 200956 and CL-6835 (Fig. 5; see also Fig. S3 in the supplemental material). In fact, this sterol profile was similar to those of different *Candida* species with *ERG11* gene deletions (42, 56). Sequencing and structural analysis of the pro-

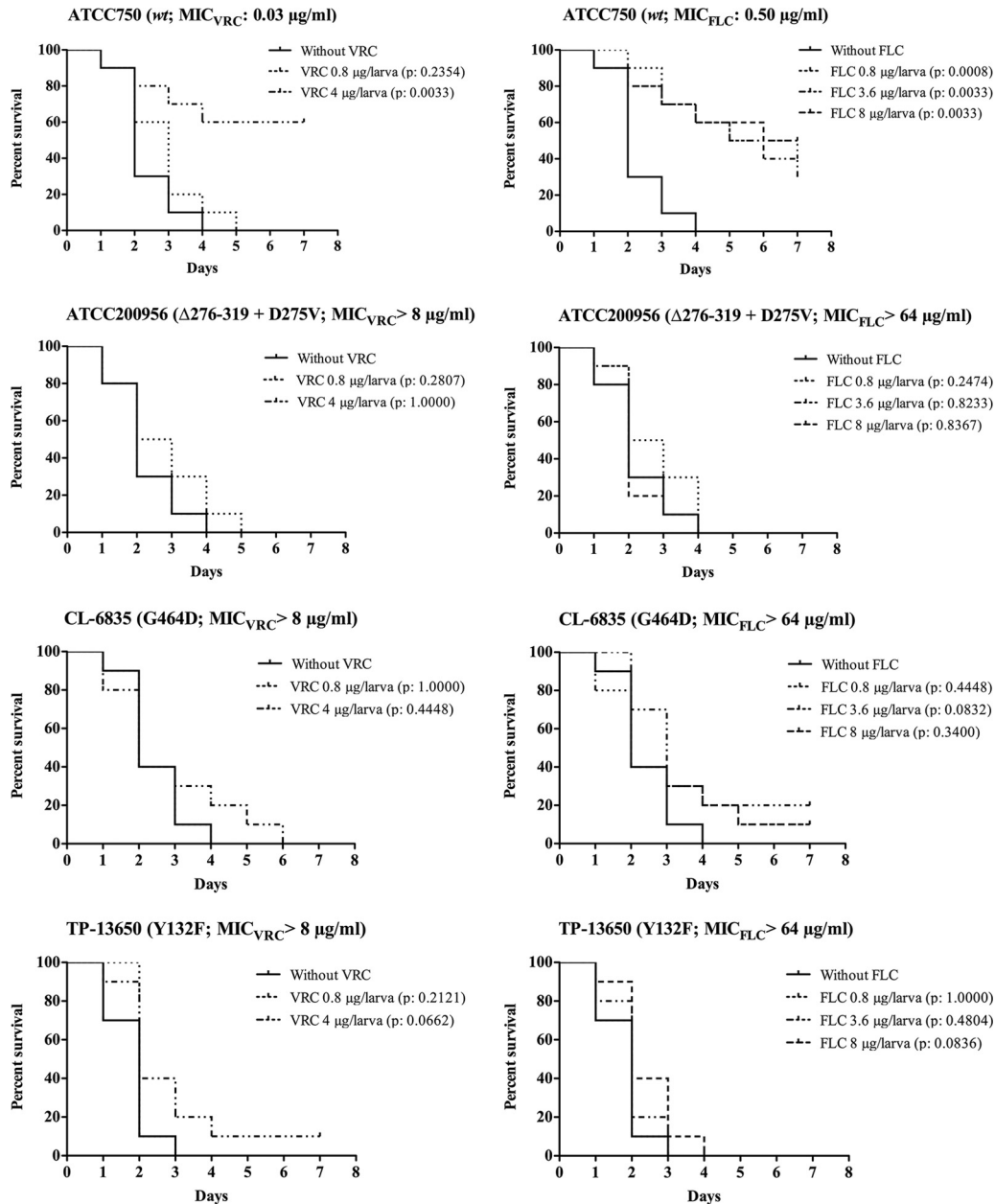


FIG 2 Efficacies of fluconazole (FLC) and voriconazole (VRC) for *Galleria mellonella* infected with different strains of *Candida tropicalis*. Ten larvae per group were infected with 2×10^6 cells of *C. tropicalis* ATCC 750, CL-6835, or TP-13650. For *C. tropicalis* ATCC 200956, an inoculum of 4×10^6 cells was used. After inoculation, larvae were treated with 0.8 or 4 µg of VRC/larva (subtherapeutic and therapeutic doses, respectively) or with 0.8, 3.6, or 8 µg of FLC/larva (subtherapeutic and therapeutic doses and twice the therapeutic dose, respectively). An untreated control group was included. Larva survival was monitored daily; the larvae are considered dead when they do not respond to touch.

teins showed that strain ATCC 200956 has a deletion of 44 amino acids in Erg11p that corresponds to the excision of the “I” helix in the azole target. That deletion would presumably render the protein nonfunctional, which would explain both the lack of ergosterol and the accumulation of 14 α -methylated sterols, and therefore the resistance to amphotericin B. In fact, during the revision of this work, an identical azole/amphotericin B resistance mechanism was described in a clinical isolate of *C. tropicalis* isolated in Tunisia (54).

Examination of the *C. albicans* Erg11p 3D protein models in combination with azole drugs suggests that the portion of the

protein that is lacking (helix I) is likely to be the cause of the lack of interaction either with the substrate (lanosterol) or with azole drugs (26, 57). In fact, in *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*, a single mutation at that level is enough to nullify the function of native Erg11p (56, 58).

The effects of Erg11p mutations at G464 and Y132 on azole susceptibility have been reported previously in different yeasts and filamentous fungi (59–63). The Y132H and G464S modifications conferred azole resistance on *C. albicans* (59). Also, the effects of different *ERG11* mutations have been explored by heterologous expression in *S. cerevisiae* (24, 64). In addition, several studies

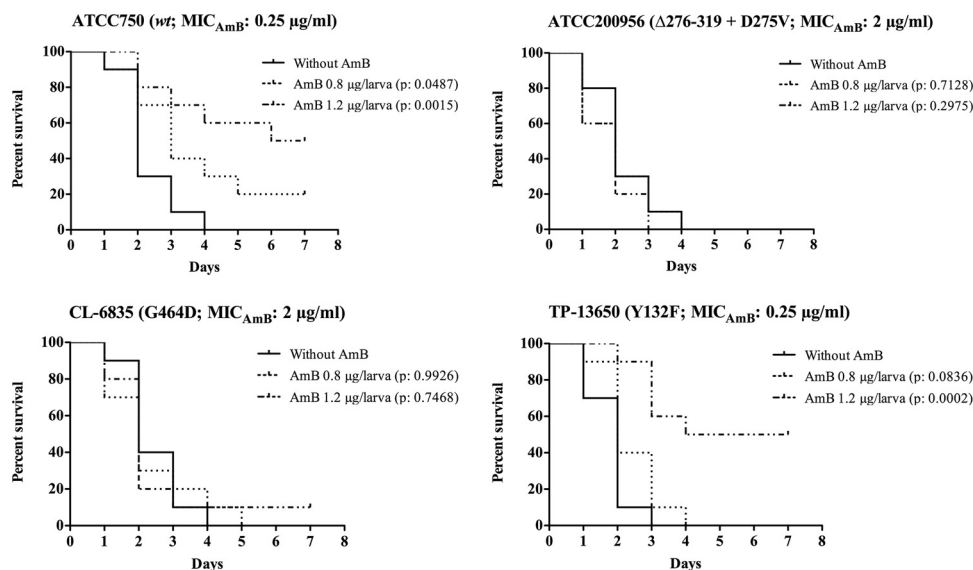


FIG 3 Efficacy of amphotericin B (AMB) in *Galleria mellonella* infected with different strains of *Candida tropicalis*. Ten larvae per group were infected with 2×10^6 cells of *C. tropicalis* ATCC 750, CL-6835, or TP-13650. For *C. tropicalis* ATCC 200956, an inoculum of 4×10^6 cells was used. After inoculation, larvae were treated with 0.8 or 1.2 µg of AMB/larva (subtherapeutic and therapeutic doses, respectively). An untreated control group was included. Larva survival was monitored daily; the larvae are considered dead when they do not respond to touch.

performed with microsomal fractions and purified enzyme preparations have been used to analyze the relationship between Erg11p amino acid substitutions and reductions in the level of azole binding (22, 65). Those authors concluded that the azole nitrogen could not interact with the iron of the heme of *C. albicans* Erg11p (CaErg11p) with Y132H or G464S, as normally occurs to produce inhibition. In contrast, the altered protein retained the ability to metabolize the substrate, comparably to the *ERG11* wild-type strain, allowing resistant mutants to produce ergosterol (23, 64).

That is the case in strain TP-13650; the presence of phenylalanine at position 132 produces the loss of a bridge of hydrogen that is normally formed between heme and tyrosine. This modification in the environment of heme would alter the binding to azoles without modifying the activity of the enzyme. This difference is marked by a wild-type sterol profile, resistance to metabolic inhibitors (due to a normal cytoplasmic membrane), and susceptibility to amphotericin B. The modeling of wild-type protein and a variant with equivalent residues mutated in fungal plant pathogens, such as Y137F in *Mycosphaerella graminicola*, has provided

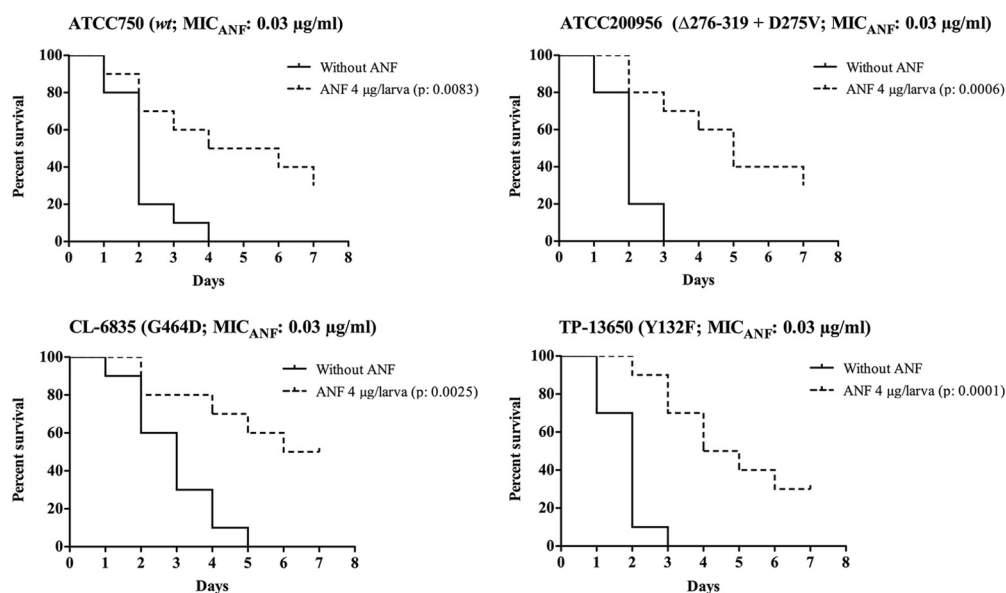


FIG 4 Efficacy of anidulafungin (ANF) in *Galleria mellonella* infected with different strains of *Candida tropicalis*. Ten larvae per group were infected with 2×10^6 cells of *C. tropicalis* ATCC 750, CL-6835, or TP-13650. For *C. tropicalis* ATCC 200956, an inoculum of 4×10^6 cells was used. After inoculation, larvae were treated with 4 µg of ANF/larva. An untreated control group was included. Larva survival was monitored daily; the larvae are considered dead when they do not respond to touch.

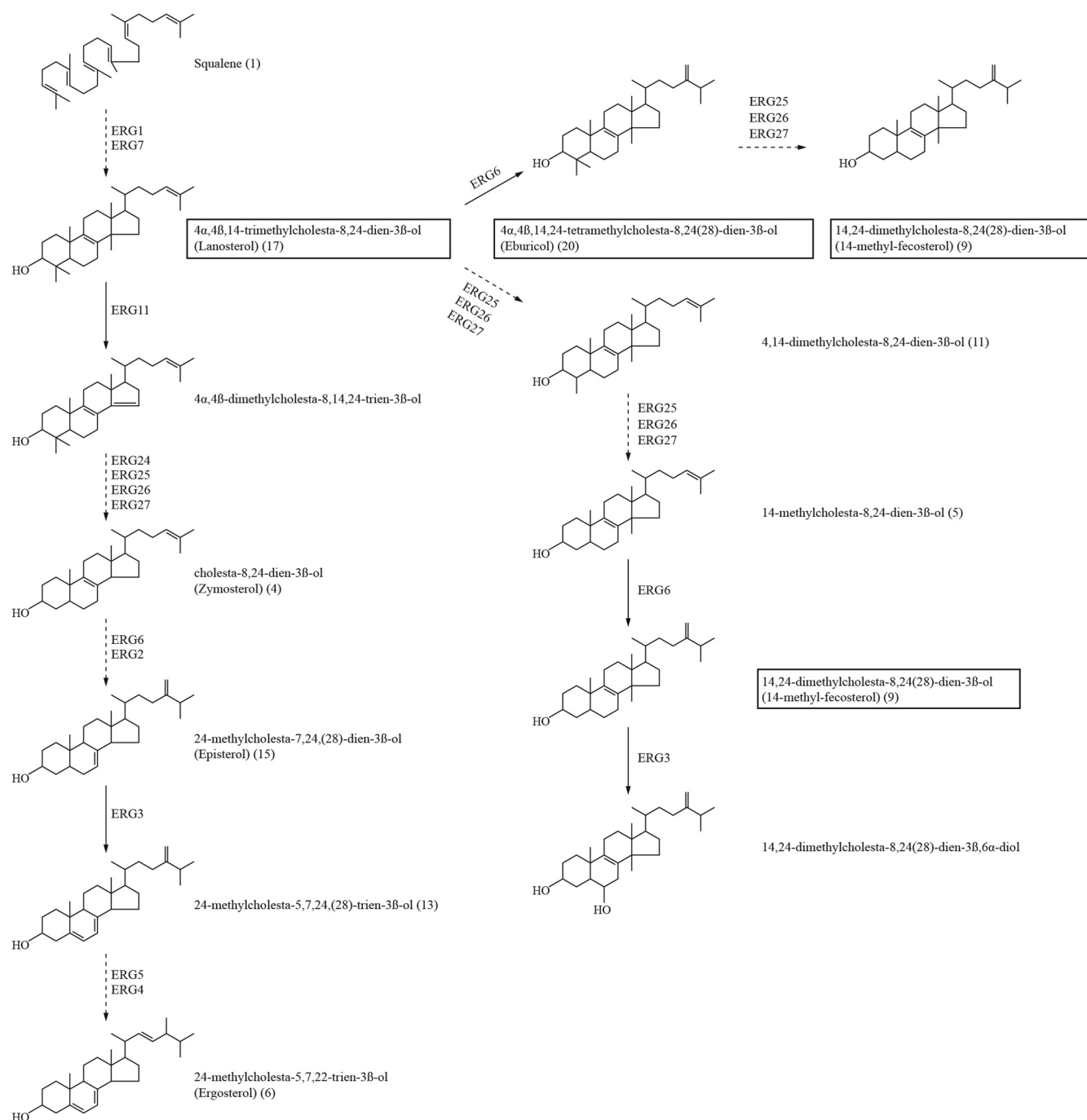


FIG 5 Ergosterol biosynthetic pathway in *Candida tropicalis*. Major sterol intermediates that accumulate in *C. tropicalis* strains with nonfunctional Erg11p are boxed. Broken arrows indicate multiple enzymatic steps; solid arrows indicate single enzymatic steps. The numbers in parentheses refer to the sterols described in Table 2.

similar results (65), which are consistent with the resistance recorded for other plant pathogens (Y136F in *Mycosphaerella fijiensis*, Y136F in *Erysiphe graminis*, and Y136F in *Uncinula necator* [66–68]).

On the other hand, although G464 cannot interact with fluconazole directly, this position might be important for the conformation of the heme environment. Changing glycine to other residues would be expected to decrease the flexibility required for

interdomain conformational changes upon inhibitor or substrate binding (57). In strain CL-6835, the absence of ergosterol and a pattern of sterol metabolites similar to that of strain ATCC 200956 would suggest that the Erg11p amino acid substitution G464D (Fig. 1E), located at the catalytic heme binding domain, will affect equally the affinity of the azole for the azole and its affinity for the substrate. This could be due to the negative charge or the larger size of aspartic acid, producing a great disturbance in the environ-

ment of the heme and preventing the binding of the substrate/inhibitor. In fact, in *C. albicans* Erg11p with the G464S substitution, although no difference in the affinity of the substrate was observed between the mutant and the wild-type protein, reduced sterol demethylase catalytic activity was observed (63). The sterol profile confirmed that possibility, since this strain has a complete lack of ergosterol and an accumulation of 14 α -methylated sterols, thus showing cross-resistance to azole and amphotericin B, as was the case with strain ATCC 200956. Interestingly, strain CL-6835 is the first reported isolate that carries an aspartic acid substitution at position G464.

It has been reported that disruption of ergosterol biosynthesis at the Erg11p level results in toxic metabolites. Cell growth arrest correlates with the accumulation of 14 α -methyl-ergosta-8,24(28)-dien-3 β ,6 α -diol in yeasts with a sterol 14 α -demethylase gene disruption. In this situation, 14 α -methylated sterols are converted to toxic 3,6-diol derivatives by Δ 5,6 desaturation performed by the enzyme Erg3p (Fig. 5). However, cells can overcome the effect of such a block by a suppressor mutation in sterol C5,6 desaturation and can thus acquire azole resistance (69). In agreement with this observation, azole-resistant fungal isolates with nonfunctional *ERG3* alleles have been described for *C. albicans* and *Candida dubliniensis* (70–72). Both strains with a putative block at the Erg11p level (CL-6835 and ATCC 200956) carried *ERG3* mutations (Table 1) and showed an accumulation of 24-methylcholesta-5,7,24(28)-trien-3-ol (Table 2), suggesting that these two strains might have evolved to avoid the production of toxic sterols like 14,24-dimethylcholesta-8,24(28)-3 β ,6 α -diol (Fig. 5). On the other hand, it is possible that changes in overall membrane composition could compensate for perturbations in sterol content, a scenario consistent with reports of other ergosterol-deficient yeasts with dysfunctional Erg11p that remain aerobically viable (56). Although our results agree with those of other studies regarding activity alterations of Erg11p and Erg3p (54), future work would include functional characterization of these enzymes by gene deletion or other genetic approaches, such as heterologous expression and site-directed mutagenesis, in order to fully understand the enzymatic activities of these proteins in these particular clinical isolates.

Since two of the strains, CL-6835 and TP-13652, were isolated from patients with candidiasis refractory to antifungal treatment, we attempted to determine the therapeutic effects of azoles in an *in vivo* model. Due to the strong structural and functional similarities between the innate immune responses of insects and mammals (73), several minihosts are now being employed to study alterations in microbial virulence and the efficacy of antimicrobial agents. Among them, *Galleria mellonella* presents certain benefits in comparison with other nonmammalian models of infection (31). For example, the larvae can be maintained at a temperature range of 25°C to 37°C, thus reproducing both at the temperature at which fungi exist in the environment and at the temperature at which they are capable of producing invasive infections in humans. In addition, an accurate inoculum of the pathogen can be delivered directly into the host's body (34). Finally, the number of larvae used and the ease of handling also represent important advantages. Previous studies have documented that *G. mellonella* is a valid model for the evaluation of microbial virulence and/or the efficacies of different antimicrobial agents in infections caused by different bacteria (32–38) and fungi, such as *Cryptococcus neoformans* (34), *Candida* spp. (38), *Fusarium* spp. (35), and *Asper-*

gillus fumigatus (36). Recently, Mesa-Arango et al. (37) demonstrated that *C. tropicalis* is able to infect and kill *G. mellonella*. The lethal effect of *C. tropicalis* depends on both the yeast dose and the incubation temperature. In larvae infected with antifungal-susceptible *C. tropicalis*, the fungal burdens increased in a time-dependent manner, and treatment with either amphotericin B or fluconazole reduced the number of CFU in the worm. Also, antifungal treatment was associated with the formation of cell aggregates around infected areas. Taking this into account, along with other published works (34, 35), we used the *G. mellonella* model to evaluate the efficacies of different antifungal drugs against *C. tropicalis* infection. The *in vivo* response correlates very well with the antifungal susceptibility phenotype shown *in vitro*. Fluconazole or voriconazole treatment is capable of improving the survival of larvae infected with azole-susceptible *C. tropicalis* (ATCC 750). These drugs improve survival in a dose-dependent manner. In fact, voriconazole and fluconazole are effective when the doses recommended for humans to treat invasive candidiasis or candidemia are used (11). On the other hand, these antifungal drugs are ineffective for larvae infected with azole-resistant strains (ATCC 200956, CL-6835, and TP-13650). However, amphotericin B treatment at therapeutic doses (1.2 μ g/larva) improves larval survival when strains ATCC 750 and TP-13650 (amphotericin B susceptible) are used for infection but fail to improve the survival of larvae infected with strain CL-6835 or ATCC 200956 (amphotericin B resistant). The response to anidulafungin was used as a control for drug efficacy and to evaluate if the model was able to reproduce the *in vitro* phenotype of susceptibility to echinocandin drugs for all the strains. Anidulafungin treatment showed a decrease in the mortality of larvae, independently of the strain. We confirmed that the *G. mellonella* host is very useful for evaluation of the *in vivo* efficacies of antifungal agents in an experimental model of candidiasis.

In summary, we report the study of different mechanisms responsible for single and combined azole and amphotericin B resistance in *C. tropicalis* clinical isolates. Although increased efflux or missense mutations in *ERG11* are the most frequent mechanisms involved in azole resistance, the decreased susceptibility of these isolates to azoles seemed to be due to an *ERG11* gene deletion/amino acid substitution in an area of the protein affecting the site for both substrate binding and azole binding. The interruption of the ergosterol biosynthesis pathway would, in turn, be responsible for amphotericin B resistance in strains lacking functional Erg11p. The results of our study elucidate important characteristics and potential mechanisms of fluconazole and amphotericin B resistance in *C. tropicalis*. In addition, we validated *G. mellonella* as a simple nonmammalian model system that can be used to study *in vitro-in vivo* correlation of antifungals. *Galleria mellonella* larvae infected with *Candida tropicalis* strains showing *in vitro* resistance to amphotericin B, fluconazole, and voriconazole failed treatment with these antifungals but responded to echinocandins.

ACKNOWLEDGMENTS

E.M. was supported by the European Science Foundation (Fuminomics 06-RNP-132), the Research Projects from the Spanish Ministry of Science and Innovation (ERA-NET Pathogenomics [7th FP], BFU2008-04709-E/BMC), and the Fondo de Investigación Sanitaria (PI12_02376, MPY1003/13). L.A.-F. is funded by the Spanish Fondo de Investigación Sanitaria with a Miguel Servet fellowship (FIS ref. CP11/00026). A.F. is funded by a

fellowship from the Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (MAEC-AECID, Convocatoria 2011–2012, 0000557290). A.A.-I. and L.B.-M. have a research contract from the Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD06/0008). A.C.M.-A. is funded by a grant from the Fundación Carolina and the University of Antioquia, Medellín, Colombia.

We thank Franco Forastiero for computer drawing assistance and Gema del Río for technical support.

All authors declare that this research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

ADDENDUM

During the revision of this article, a related work, on the same resistance mechanism, by Eddouzi et al. (54) was accepted by *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.

REFERENCES

- Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Ellis D, Tullio V, Rodloff A, Fu W, Ling TA. 2010. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. *J. Clin. Microbiol.* **48**: 1366–1377.
- Negri M, Silva S, Henriques M, Oliveira R. 2012. Insights into *Candida tropicalis* nosocomial infections and virulence factors. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **31**:1399–1412.
- Pfaller MA, Messer SA, Moet GJ, Jones RN, Castanheira M. 2011. *Candida* bloodstream infections: comparison of species distribution and resistance to echinocandin and azole antifungal agents in intensive care unit (ICU) and non-ICU settings in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008–2009). *Int. J. Antimicrob. Agents* **38**:65–69.
- Pemán J, Cantón E, Quindós G, Eraso E, Alcoba J, Guinea J, Merino P, Ruiz-Pérez-de-Piapa MT, Pérez del Molino L, Linares-Sicilia MJ, Marco F, García J, Roselló EM, Gómez-García-de-la-Pedrosa E, Borrell N, Porras A, Yagüe G, on behalf of the FUNGEMYCA Study Group. 2012. Epidemiology, species distribution and in vitro antifungal susceptibility of fungaemia in a Spanish multicentre prospective survey. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**:1181–1187.
- Chakrabarti A, Chatterjee SS, Rao KL, Zameer MM, Shivaprakash MR, Singhi S, Singh R, Varma SC. 2009. Recent experience with fungaemia: change in species distribution and azole resistance. *Scand. J. Infect. Dis.* **41**:275–284.
- Adhikary R, Joshi S. 2011. Species distribution and anti-fungal susceptibility of candidaemia at a multi super-speciality center in Southern India. *Indian J. Med. Microbiol.* **29**:309–311.
- Kothavade RJ, Kura MM, Valand AG, Panthaki MH. 2010. *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. *J. Med. Microbiol.* **59**:873–880.
- Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouér SA, Arthington-Skaggs B, da Matta DA, Warnock D, Morgan J. 2006. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J. Clin. Microbiol.* **44**:2816–2823.
- Kontoyannis DP, Vaziri I, Hanna HA, Boktour M, Thornby J, Hachem R, Bodey GP, Raad II. 2001. Risk factors for *Candida tropicalis* fungemia in patients with cancer. *Clin. Infect. Dis.* **33**:1676–1681.
- Chai LY, Denning DW, Warn P. 2010. *Candida tropicalis* in human disease. *Crit. Rev. Microbiol.* **36**:282–298.
- Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK, Jr, Calandra TF, Edwards JE, Jr, Filler SG, Fisher JF, Kullberg BJ, Ostrosky-Zeichner L, Reboli AC, Rex JH, Walsh TJ, Sobel JD. 2009. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* **48**:503–535.
- Ullmann AJ, Cornely OA, Donnelly JP, Akova M, Arendrup MC, Arikan-Akdagli S, Bassetti M, Bille J, Calandra T, Castagnola E, Garbino J, Groll AH, Herbrecht R, Hope WW, Jensen HE, Kullberg BJ, Lass-Flörl C, Lortholary O, Meersseman W, Petrakos G, Richardson MD, Roilides E, Verweij PE, Viscoli C, Cuenca-Estrella M, ESCMID Fungal Infection Study Group. 2012. ESCMID guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: developing European guidelines in clinical microbiology and infectious diseases. *Clin. Microbiol. Infect.* **18**(Suppl 7):1–8.
- Myoken Y, Kyo T, Fujihara M, Sugata T, Mikami Y. 2004. Clinical significance of breakthrough fungemia caused by azole-resistant *Candida tropicalis* in patients with hematologic malignancies. *Haematologica* **89**: 378–380.
- Vandeputte P, Larcher G, Bergés T, Renier G, Chabasse D, Bouchara JP. 2005. Mechanisms of azole resistance in a clinical isolate of *Candida tropicalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:4608–4615.
- Yang YL, Wang AH, Wang CW, Cheng WT, Li SY, Lo HJ; TSARY Hospitals. 2008. Susceptibilities to amphotericin B and fluconazole of *Candida* species in Taiwan Surveillance of Antimicrobial Resistance of Yeasts 2006. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **61**:175–180.
- Rex JH, Cooper CR, Merz WG, Jr, Galgiani JN, Anaissie EJ. 1995. Detection of amphotericin B-resistant *Candida* isolates in a broth-based system. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:906–909.
- Cantón E, Pemán J, Gobernado M, Viudes A, Espinel-Ingroff A. 2004. Patterns of amphotericin B killing kinetics against seven *Candida* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:2477–2482.
- Lupetti A, Danesi R, Campa M, Del Tacca M, Kelly S. 2002. Molecular basis of resistance to azole antifungals. *Trends Mol. Med.* **8**:76–81.
- Sanglard D, Odds FC. 2002. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect. Dis.* **2**:73–85.
- Pfaller MA. 2012. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *Am. J. Med.* **125**:S3–S13.
- Perea S, López-Ribot JL, Kirkpatrick WR, McAtee RK, Santillán RA, Martínez M, Calabrese D, Sanglard D, Patterson TF. 2001. Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:2676–2684.
- Morio F, Loge C, Besse B, Hennequin C, Le Pape P. 2010. Screening for amino acid substitutions in the *Candida albicans* Erg11 protein of azole-susceptible and azole-resistant clinical isolates: new substitutions and a review of the literature. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **66**:373–384.
- Kelly SL, Lamb DC, Kelly DE. 1999. Y132H substitution in *Candida albicans* sterol 14 α -demethylase confers fluconazole resistance by preventing binding to haem. *FEMS Microbiol. Lett.* **180**:171–175.
- Sanglard D, Ischer F, Koymans L, Bille J. 1998. Amino acid substitutions in the cytochrome P-450 lanosterol 14 α -demethylase (CYP51A1) from azole-resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:241–253.
- Becher R, Wirsig SG. 2012. Fungal cytochrome P450 sterol 14 α -demethylase (CYP51) and azole resistance in plant and human pathogens. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **95**:825–840.
- Xiao L, Madison V, Chau AS, Loebenberg D, Palermo RE, McNicholas PM. 2004. Three-dimensional models of wild-type and mutated forms of cytochrome P450 14 α -sterol demethylases from *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* provide insights into posaconazole binding. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:568–574.
- Jiang C, Dong D, Yu B, Cai G, Wang X, Ji Y, Peng Y. 2013. Mechanisms of azole resistance in 52 clinical isolates of *Candida tropicalis* in China. *J. Antimicrob. Chemother.* **68**:778–785.
- Barchiesi F, Calabrese D, Sanglard D, Falcone Di Francesco L, Caselli F, Giannini D, Giacometti A, Gavaudan S, Scalise G. 2000. Experimental induction of fluconazole resistance in *Candida tropicalis* ATCC 750. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:1578–1584.
- MacCallum DM, Coste A, Ischer F, Jacobsen MD, Odds FC, Sanglard D. 2010. Genetic dissection of azole resistance mechanisms in *Candida albicans* and their validation in a mouse model of disseminated infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**:1476–1483.
- Miyazaki T, Miyazaki Y, Izumikawa K, Kakeya H, Miyakoshi S, Bennett JE, Kohno S. 2006. Fluconazole treatment is effective against a *Candida albicans* erg3/erg3 mutant in vivo despite in vitro resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:580–586.
- Desalermos A, Fuchs BB, Mylonakis E. 2012. Selecting an invertebrate model host for the study of fungal pathogenesis. *PLoS Pathog.* **8**:e1002451. doi:10.1371/journal.ppat.1002451.
- Desbois AP, Coote PJ. 2011. Wax moth larva (*Galleria mellonella*): an in vivo model for assessing the efficacy of antistaphylococcal agents. *J. Antimicrob. Chemother.* **66**:1785–1790.

33. Harding CR, Schroeder GN, Reynolds S, Kosta A, Collins JW, Mousnier A, Frankel G. 2012. *Legionella pneumophila* pathogenesis in the *Galleria mellonella* infection model. *Infect. Immun.* 80:2780–2790.
34. Mylonakis E, Moreno R, El Khoury JB, Idnurm A, Heitman J, Calderwood SB, Ausubel FM, Diener A. 2005. *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Infect. Immun.* 73:3842–3850.
35. Coleman JJ, Muhammed M, Kasperkovitz PV, Vyas JM, Mylonakis E. 2011. *Fusarium* pathogenesis investigated using *Galleria mellonella* as a heterologous host. *Fungal Biol.* 115:1279–1289.
36. Slater JL, Gregson L, Denning DW, Warn PA. 2011. Pathogenicity of *Aspergillus fumigatus* mutants assessed in *Galleria mellonella* matches that in mice. *Med. Mycol.* 49:S107–S113.
37. Mesa-Arango AC, Forastiero A, Bernal-Martínez L, Cuenca-Estrella M, Mellado E, Zaragoza O. 2013. The non-mammalian host *Galleria mellonella* can be used to study the virulence of the fungal pathogen *Candida tropicalis* and the efficacy of antifungal drugs during infection by this pathogenic yeast. *Med. Mycol.* 51:461–472.
38. Scorzoni L, de Lucas MP, Mesa-Arango AC, Fusco-Almeida AM, Lozano E, Cuenca-Estrella M, Mendes-Giannini MJ, Zaragoza O. 2013. Antifungal efficacy during *Candida krusei* infection in non-conventional models correlates with the in vitro susceptibility profile. *PLoS One* 8:e60047. doi:10.1371/journal.pone.0060047.
39. Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C, Hope W. EUCAST-AFST. 2012. EUCAST technical note on the EUCAST definitive document EDef 7.2: method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts EDef 7.2 (EUCAST-AFST). *Clin. Microbiol. Infect.* 18:E246–E247.
40. Lass-Flörl C, Arendrup MC, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Donnelly P, Hope W; European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing–Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing. 2011. EUCAST technical note on amphotericin B. *Clin. Microbiol. Infect.* 17:E27–E29.
41. Arendrup MC, Rodríguez-Tudela JL, Lass-Flörl C, Cuenca-Estrella M, Donnelly JP, Hope W. EUCAST-AFST. 2011. EUCAST technical note on anidulafungin. *Clin. Microbiol. Infect.* 17:E18–E20.
42. Sanglard D, Ischer F, Parkinson T, Falconer D, Bille J. 2003. *Candida albicans* mutations in the ergosterol biosynthetic pathway and resistance to several antifungal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:2404–2412.
43. Jeanmougin F, Thompson JD, Gouy M, Higgins DG, Gibson TJ. 1998. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem. Sci.* 23: 403–405.
44. Arthington-Skaggs BA, Lee-Yang W, Ciblak MA, Frade JP, Brandt ME, Hajjeh RA, Harrison LH, Sofair AN, Warnock DW, for the Candidemia Active Surveillance Group. 2002. Comparison of visual and spectrophotometric methods of broth microdilution MIC end point determination and evaluation of a sterol quantitation method for in vitro susceptibility testing of fluconazole and itraconazole against trailing and nontrailing *Candida* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:2477–2481.
45. Alcazar-Fuoli L, Mellado E, García-Effron G, López JF, Grimalt JO, Cuenca-Estrella JM, Rodríguez-Tudela JL. 2008. Ergosterol biosynthesis pathway in *Aspergillus fumigatus*. *Steroids* 73:339–347.
46. Méjanelle L, López JF, Gunde-Cimerman N, Grimalt JO. 2001. Ergosterol biosynthesis in novel melanized fungi from hypersaline environments. *J. Lipid Res.* 42:352–358.
47. Yasmin S, Alcazar-Fuoli L, Gründlinger M, Puempel T, Cairns T, Blatzer M, López JF, Grimalt JO, Bignell E, Haas H. 2012. Mevalonate governs interdependency of ergosterol and siderophore biosyntheses in the fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109:E497–E504.
48. Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. 2006. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 22:195–201.
49. Kiefer F, Arnold K, Künzli M, Bordoli L, Schwede T. 2009. The SWISS-MODEL Repository and associated resources. *Nucleic Acids Res.* 37: D387–D392.
50. Peitsch MC. 1995. Protein modeling by E-mail. *Bio/Technology* 13:658–660.
51. Strushkevich N, Usanov SA, Park HW. 2010. Structural basis of human CYP51 inhibition by antifungal azoles. *J. Mol. Biol.* 397:1067–1078.
52. Maesaki S, Marichal P, Vanden Bossche H, Sanglard D, Kohno S. 1999. Rhodamine 6G efflux for the detection of CDR1 overexpressing azole-resistant *Candida albicans* strains. *J. Antimicrob. Chemother.* 44:27–31.
53. Melo F, Feytmans E. 1998. Assessing protein structures with a non-local atomic interaction energy. *J. Mol. Biol.* 277:1141–1152.
54. Eddouzi J, Parker JE, Vale-Silva LA, Coste A, Ischer F, Kelly S, Manai M, Sanglard D. 2013. Molecular mechanisms of drug resistance in clinical *Candida* species isolated in Tunisian hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57:3182–3193.
55. Marichal P, Koymans L, Willemsens S, Bellens D, Verhasselt P, Luyten W, Borgers M, Ramaekers FC, Odds FC, Bossche HV. 1999. Contribution of mutations in the cytochrome P450 14 α -demethylase (Erg11p, Cyp51p) to azole resistance in *Candida albicans*. *Microbiology* 145:2701–2713.
56. Hull CM, Parker JE, Bader O, Weig M, Gross U, Warrilow AG, Kelly DE, Kelly SL. 2012. Facultative sterol uptake in an ergosterol-deficient clinical isolate of *Candida glabrata* harboring a missense mutation in *ERG11* and exhibiting cross-resistance to azoles and amphotericin B. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56:4223–4232.
57. Podust LM, Poulos TL, Waterman MR. 2001. Crystal structure of cytochrome P450 14 α -sterol demethylase (CYP51) from *Mycobacterium tuberculosis* in complex with azole inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98:3068–3073.
58. Ishida N, Aoyama Y, Hatanaka R, Oyama Y, Imajo S, Ishiguro M, Oshima T, Nakazato H, Noguchi T, Maitra US, Mohan VP, Sprinson DB, Yoshida Y. 1988. A single amino acid substitution converts cytochrome P450(14DM) to an inactive form, cytochrome P450SG1: complete primary structures deduced from cloned DNAs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 155:317–323.
59. Chau AS, Mendrick CA, Sabatelli FJ, Loebenberg D, McNicholas PM. 2004. Application of real-time quantitative PCR to molecular analysis of *Candida albicans* strains exhibiting reduced susceptibility to azoles. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:2124–2131.
60. Sionov E, Chang YC, Garraffo HM, Dolan MA, Ghannoum MA, Kwon-Chung KJ. 2012. Identification of a *Cryptococcus neoformans* cytochrome P450 lanosterol 14 α -demethylase (*Erg11*) residue critical for differential susceptibility between fluconazole/voriconazole and itraconazole/posaconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56:1162–1169.
61. Rodero L, Mellado E, Rodríguez AC, Salve A, Guelfand L, Cahn P, Cuenca-Estrella M, Davel G, Rodríguez-Tudela JL. 2003. G484S amino acid substitution in lanosterol 14- α demethylase (*ERG11*) is related to fluconazole resistance in a recurrent *Cryptococcus neoformans* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:3653–3656.
62. Pelaez T, Gijón P, Bunsow E, Bouza E, Sánchez-Yebra W, Valerio M, Gama B, Cuenca-Estrella M, Mellado E. 2012. Resistance to voriconazole due to a G448S substitution in *Aspergillus fumigatus* in a patient with cerebral aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.* 50:2531–2534.
63. Kelly SL, Lamb DC, Loeffler J, Einsele H, Kelly DE. 1999. The G464S amino acid substitution in *Candida albicans* sterol 14 α -demethylase causes fluconazole resistance in the clinic through reduced affinity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 262:174–179.
64. Park HG, Lee IS, Chun IJ, Yun CH, Johnston JB, Ortiz de Montellón PR, Kim D. 2011. Heterologous expression and characterization of the sterol 14 α -demethylase CYP51F1 from *Candida albicans*. *Arch. Biochem. Biophys.* 509:9–15.
65. Mullins JGL, Parker JE, Cools HJ, Togawa RC, Lucas JA, Fraaije BA, Kelly DE, Kelly S. 2011. Molecular modelling of the emergence of azole resistance in *Mycosphaerella graminicola*. *PLoS One* 6:e20973. doi:10.1371/journal.pone.0020973.
66. Délye C, Laigret F, Corio-Costet MF. 1997. A mutation in the 14 α -demethylase gene of *Uncinula necator* that correlates with resistance to a sterol biosynthesis inhibitor. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:2966–2970.
67. Cañas-Gutiérrez GP, Angarita-Velásquez MJ, Restrepo-Flórez JM, Rodríguez P, Moreno CX, Arango R. 2009. Analysis of the CYP51 gene and encoded protein in propiconazole-resistant isolates of *Mycosphaerella fijiensis*. *Pest. Manag. Sci.* 65:892–899.
68. Délye C, Bousset L, Corio-Costet MF. 1998. PCR cloning and detection of point mutations in the eburicol 14 α -demethylase (CYP51) gene from *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*, a “recalcitrant” fungus. *Curr. Genet.* 34:399–403.
69. Kelly SL, Lamb DC, Corran AJ, Baldwin BC, Kelly DE. 1995. Mode of action and resistance to azole antifungals associated with the formation of 14 α -methylergosta-8,24(28)-dien-3 β ,6 α -diol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 207:910–915.
70. Pinjon E, Moran GP, Jackson CJ, Kelly SL, Sanglard D, Coleman

- DC, Sullivan DJ. 2003. Molecular mechanisms of itraconazole resistance in *Candida dubliniensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 2424–2437.
71. Morio F, Pagniez F, Lacroix C, Miegerville M, Le Pape P. 2012. Amino acid substitutions in the *Candida albicans* sterol $\Delta 5,6$ -desaturase (Erg3p) confer azole resistance: characterization of two novel mutants with impaired virulence. *J. Antimicrob. Chemother.* 67:2131–2138.
72. Martel CM, Parker JE, Bader O, Weig M, Gross U, Warrilow AG, Rolley N, Kelly DE, Kelly SL. 2010. Identification and characterization of four azole-resistant *erg3* mutants of *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:4527–4533.
73. Kavanagh K, Reeves EP. 2004. Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* 28:101–112.

Antifungal Efficacy during *Candida krusei* Infection in Non-Conventional Models Correlates with the Yeast *In Vitro* Susceptibility Profile

Liliana Scorzoni^{1,2}, Maria Pilar de Lucas³, Ana Cecilia Mesa-Arango^{1,4}, Ana Marisa Fusco-Almeida², Encarnación Lozano³, Manuel Cuenca-Estrella¹, Maria Jose Mendes-Giannini^{2*}, Oscar Zaragoza^{1*}

1 Mycology Reference Laboratory, National Centre for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain, **2** Laboratório de Micologia Clínica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista de São Paulo, Araraquara, Brazil, **3** Department of Cellular Biology, National Centre for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain, **4** Group of Investigative Dermatology, University of Antioquia, Medellín, Colombia

Abstract

The incidence of opportunistic fungal infections has increased in recent decades due to the growing proportion of immunocompromised patients in our society. *Candida krusei* has been described as a causative agent of disseminated fungal infections in susceptible patients. Although its prevalence remains low among yeast infections (2–5%), its intrinsic resistance to fluconazole makes this yeast important from epidemiologic aspects. Non mammalian organisms are feasible models to study fungal virulence and drug efficacy. In this work we have used the lepidopteran *Galleria mellonella* and the nematode *Caenorhabditis elegans* as models to assess antifungal efficacy during infection by *C. krusei*. This yeast killed *G. mellonella* at 25, 30 and 37°C and reduced haemocytic density. Infected larvae melanized in a dose-dependent manner. Fluconazole did not protect against *C. krusei* infection, in contrast to amphotericin B, voriconazole or caspofungin. However, the doses of these antifungals required to obtain larvae protection were always higher during *C. krusei* infection than during *C. albicans* infection. Similar results were found in the model host *C. elegans*. Our work demonstrates that non mammalian models are useful tools to investigate *in vivo* antifungal efficacy and virulence of *C. krusei*.

Citation: Scorzoni L, de Lucas MP, Mesa-Arango AC, Fusco-Almeida AM, Lozano E, et al. (2013) Antifungal Efficacy during *Candida krusei* Infection in Non-Conventional Models Correlates with the Yeast *In Vitro* Susceptibility Profile. PLoS ONE 8(3): e60047. doi:10.1371/journal.pone.0060047

Editor: Gustavo Henrique Goldman, Universidade de Sao Paulo, Brazil

Received: October 4, 2012; **Accepted:** February 20, 2013; **Published:** March 28, 2013

Copyright: © 2013 Scorzoni et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: O.Z. is funded by grant SAF2011-25140 from the Spanish Ministry for Economics and Competitiveness. L.S. is funded by a fellowship from the Agencia Española para la Cooperación Internacional y Desarrollo. *C. elegans* strain AU37 was provided by the CGC (Caenorhabditis Genetics Center), which is funded by National Institutes of Health Office of Research Infrastructure Programs (P40 OD010440). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript

Competing Interests: The authors have the following interests: In the past 5 years, M.C.E. has received grant support from Astellas Pharma, bioMérieux, Gilead Sciences, Merck Sharp and Dohme, Pfizer, Schering Plough and Soria Melguizo SA. He has been an advisor/consultant to Gilead Sciences, Merck Sharp and Dohme, Pfizer, and Schering Plough. He has been paid for talks on behalf of Gilead Sciences, Merck Sharp and Dohme, Pfizer, and Schering Plough. There are no patents, products in development or marketed products to declare. This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials.

* E-mail: giannini@fcfcar.unesp.br (MJMG); ozaragoza@isciii.es (OZ)

Introduction

Fungal infections have emerged worldwide due to a growing population of immunosuppressed patients, including patients with cancer, AIDS, solid-organ and hematopoietic stem cell transplant recipients, premature neonates, and patients recovering from major surgery [1–5]. These infections have significant morbidity and mortality rates and are difficult to prevent, diagnose and treat [6–8].

Candida spp are commensal yeasts responsible for different clinical manifestations, from mucocutaneous overgrowth to blood stream infections [1,9–12]. *Candida albicans* is still the major cause of invasive fungal disease. However, a growing number of infections produced by non-*albicans* *Candida* spp has been reported in the last years [1,13–15]. Among them, there are some species that are intrinsically resistant or have reduced susceptibility to antifungals. The massive use of antifungals in prophylaxis, such as fluconazole, has facilitated the selection of pathogenic fungi resistant to these agents [16–19].

Candida krusei is an opportunistic pathogen which presents intrinsic resistance to fluconazole. The infection is associated with the prophylactic or therapeutic use of this antifungal agent [20–23]. Two mechanisms of azole resistance in *C. krusei* have been described: overexpression of drug efflux pumps [24] and diminished sensitivity of the target enzyme, the cytochrome P450 sterol 14-demethylase (encoded by the *CYP51* gene) [25]. Diseases caused by *C. krusei* have high associated mortality (30–60%) [26,27]. Despite the intrinsic resistance to fluconazole, *C. krusei* is usually susceptible to voriconazole *in vitro*, which correlates with the binding of this drug to the target enzyme [21].

Antifungal resistance *in vitro* does not always correlate with clinical resistance. The best correlation between *in vitro* and clinical efficacy is found in HIV-positive patients with oropharyngeal candidiasis [22,28,29]. In contrast, although *C. parapsilosis* shows reduced *in vitro* susceptibility to echinocandins, these antifungals have been shown to be effective in the treatment of invasive candidiasis caused by this species [30].

The use of invertebrate hosts has recently emerged and facilitated the study of fungal pathogenesis. Among these non-mammalian hosts, amoebae (*Acanthamoeba castellanii*, *Dictyostellium discoideum*), nematodes (*Caenorhabditis elegans*) and insects (*Drosophila melanogaster*, *Galleria mellonella*) have been successfully used to study the virulence of some fungi [31–35]. Moreover, some aspects of the innate response are conserved between these hosts and mammals [36]. *Galleria mellonella* is a lepidopteran (Pyralidae) that provides important advantages as host model. The larvae can be incubated in a range of temperature between 25 to 37°C, so it is possible to simulate the natural fungal habitat and the infection conditions in mammals. In addition, as in mammalian models, it is possible to introduce by injection exact doses of pathogens to the larvae, which poses a technical improvement over other non-conventional hosts. *Galleria mellonella* has six types of phagocytic cells that play an important role in the defense system [37,38]. The density of these cells in the haemolymph is not constant, and changes during infection can be easily measured and used as a parameter of the response of the larvae after exposure to pathogens [39]. The viability of the larvae can be easily recorded by the lack of movement and the massive melanization induced by *G. mellonella* in response to infection [40–42]. Another organism that is used as model host is the soil nematode *Caenorhabditis elegans*, which feeds on microorganisms, but is susceptible to bacterial and fungal pathogens [33,43–45]. *Caenorhabditis elegans* has been used to study virulence, filamentation and antifungal efficacy of antifungal drugs [44,46].

In this study, we initially aimed to characterize the interaction between *G. mellonella* and *C. krusei* with two purposes: 1) To get insights about virulence traits of this pathogenic yeast, and 2) to investigate if antifungal efficacy *in vivo* correlates with the susceptibility profile shown by *C. krusei* *in vitro*. Furthermore, we have complemented our studies with *C. elegans*, and observed similar behaviors, indicating that non-conventional models can be used to investigate *C. krusei* virulence and antifungal efficacy.

Materials and Methods

Strains and media

Candida albicans SC5314 [47], *C. krusei* ATCC 6258 and two clinical isolates (CL8053 and CL80317) from the Yeast Collection of the Mycology Reference Laboratory of the Spanish National Centre for Microbiology and *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* (H99 strain, ATCC 20882) were used in this study. The yeasts were grown overnight in liquid Sabouraud medium (Difco, BD, USA) at 30°C with shaking. *Escherichia coli* OP50 strain was obtained from the *Caenorhabditis* Genetics Center (University of Minnesota) and was maintained on LB agar plates at 37°C.

Antifungal susceptibility testing (AFST)

Minimum inhibitory concentration (MIC) values were determined using the EUCAST protocol [48,49]. For AFST, 10 different clinical isolates of *C. albicans* and 10 clinical isolates of *C. krusei* were obtained from the yeast collection of the Mycology Reference Laboratory of the Spanish National Centre for Microbiology. Data were expressed as geometric mean, mode, range (minimum-maximum) and MIC frequency distribution.

Insect larvae manipulation and incubation conditions

Galleria mellonella larvae (0.3–0.5 g, R.J. Mous Livebait, The Netherlands) were placed in Petri dishes and incubated at 37°C in the dark the night before the experiments. Larvae with color alterations (i.e. dark spots or with apparent melanization) were excluded. Antifungals and yeast suspensions were injected in the

haemocoel through the last left pro-leg of the larvae using a 10 µL Hamilton syringe (Hamilton, USA). The pro-leg had been previously cleaned with 70% ethanol. A total of 10 µL were injected in each larva. Larvae death was monitored by visual inspection of the color (brown-dark brown) and by lack of movement after touching them with forceps. For each condition, a total of 20 larvae were used, and each experiment was repeated at least twice. After infection, larvae were incubated at 25, 30 or 37°C.

Survival assay

Yeasts were grown overnight in liquid Sabouraud, washed with PBS, and suspended in the same buffer. Cell density was estimated with an Automatic Cell Counter TC10 (Bio Rad). For survival assays, larvae were inoculated with 10^7 , 5×10^6 and 2.5×10^6 cells/larva of *C. krusei* and 10^6 , 5×10^5 and 10^5 cells/larva of *C. albicans*. The inocula were prepared in PBS plus 20 mg/L of ampicillin to prevent bacterial contamination. The infected larvae were incubated at 25°C, 30 or 37°C, and the death was daily monitored during 7 days.

Growth curve at different temperatures

Yeast strains were grown overnight and diluted in fresh Sabouraud liquid medium at 10^3 cells/mL. Two hundred microliters of this suspension were placed in 96-well microdilution plates, and incubated at 25, 30 or 37°C in a Labsystems IEMS Reader MF spectrophotometer. Optical density (OD) was determined at 530 nm every hour during 72 hrs.

In vivo phagocytosis assay

Yeast cells were stained with 10 µg/mL Calcofluor white (Sigma, St. Louis, MO) for 30 min at 37°C. Then, these cells were injected into *G. mellonella* larvae (10^7 cells/larva, 5 per group), and phagocytosis was analyzed after 3 hrs of incubation at 25 and 37°C. Haemolymph was collected in 1.5 mL tubes and diluted 1:1 in IPS buffer (Insect Physiological Saline: 150 mM sodium chloride, 5 mM potassium chloride, 10 mM Tris-HCl pH 6.9, 10 mM EDTA and 30 mM sodium citrate) to avoid coagulation and melanization of the haemolymph. Haemocytes were placed on a slide and phagocytosis was visually quantified using a Leica DMI 3000B microscope. One hundred haemocytes from each larva were counted in each case, and the percentage of haemocytes containing yeasts was calculated and plotted. *Cryptococcus neoformans* H99 strain was used as control. Phagocytosis was also analyzed in larvae infected in the same way, but treated with 64 mg/kg fluconazole or 4 mg/kg amphotericin B.

Determination of haemocyte density

Groups of five *G. mellonella* were infected with 10^7 yeast cells/larvae and incubated at 37°C for 3 hrs. The haemolymph of each larva was collected in 1.5 mL tubes and diluted 1:10 in IPS buffer. The cells were counted using a haemocytometer.

Measurement of in vivo filament formation

Galleria mellonella was infected with 10^7 cells/larva of *C. albicans* and *C. krusei* strains. The larvae were incubated at 37°C for 24 hours. Larvae were macerated in 100 µm nylon cell strainers (Falcon, BD, USA) with 1 mL of IPS. The liquid was then collected, centrifuged and suspended in 1 mL of the same buffer. Samples were stained with Calcofluor white (Sigma, St. Louis, MO), as described above, and yeast morphology was observed with a Leica DMI 3000B fluorescence microscope.

Melanization quantification

Larvae were infected with PBS, 5×10^5 , 10^6 and 5×10^6 cells/larva of *C. krusei*. Then, the haemolymph of each larva was collected after 3 and 24 hrs in 1.5 mL tubes and diluted 1:10 with IPS buffer. The samples were placed in 96 well microdilution plates. To quantify melanin levels, we took advantage of existing protocols that quantify laccase activity by detecting the final product of the reaction by measuring the OD in the visible range (400–500) [50,51]. In our conditions, we observed that 405 nm was an optimal OD to quantify larval melanin and to correlate the results with the visualization of the dark compound. So the OD at 405 nm was measured using a Labsystems IEMS Reader MF spectrophotometer. Melanization of larvae infected with *C. albicans* (5×10^5 cells/larva) and *C. krusei* (5×10^6 cells/larva) and treated with 64 mg/kg fluconazole and 4 mg/kg amphotericin B was also evaluated.

Treatment with antifungal drugs

Infected larvae were treated with amphotericin B (1, 2 or 4 mg/kg, Sigma Aldrich Quimica, Madrid, Spain), fluconazole (128, 64, 32, 12, or 4 mg/kg, Pfizer SA, Madrid, Spain), voriconazole (7.5 or 10 mg/kg, Pfizer SA, Madrid, Spain) or caspofungin (1, 2 or 4 mg/kg Merck & Com, Inc, NJ, USA). In some experiments, a combination of fluconazole and amphotericin B was also used. Antifungals were applied immediately after the infection. Groups of 10 larvae were treated with the antifungals alone to test the toxicity.

Fungal burden determination

Infected larvae were selected at different times of infection, washed with 70% ethanol and cut into small pieces with a scalpel. Two mL of PBS-ampicillin were added and the mix was homogenized gently with a vortex and glass beads for 10 seconds. The mix was finally suspended in 9 mL of PBS-ampicillin. Different dilutions were made for each sample and 50 μ L from these dilutions were placed on Sabouraud-chloramphenicol agar plates (Oxoid). The plates were incubated at 37°C for 48 h, and the number of colony forming units (CFUs) was determined.

Histology

Three larvae from different groups (uninfected, infected and/or treated with antifungals) were collected on different days of the infection. The larvae were preserved in 70% ethanol and longitudinal incisions were made with a scalpel in the dorsal part. The samples were fixed with 10% buffered formaline for 24 hrs. Then, the samples were dehydrated with increasing concentrations of ethanol, rinsed with xylol, and embedded in paraffin. Tissue sections (5 microns) were stained with periodic acid Schiff (PAS) solution and observed with a Leica DMI3000 microscope.

Caenorhabditis elegans strain and infection conditions

The following *C. elegans* mutant strain, obtained from CGC, was used in all experiments: AU37 (*glp-4(bn2)* I; *sek-1(km4)* X). This strain was grown on agar plates seeded with *E. coli* OP50 and incubated at 15°C according to standard procedures [52]. This strain is usually chosen for virulence and antifungal efficacy assays because *glp-4* mutants are sterile at 25°C. This allows to easily following up the survival of the individual animals from the beginning to the end of the experiment and avoids mixing with their progeny [33,44]. The *sek-1* gene encodes a mitogen-activated protein kinase which is important for the defense of *C. elegans* against microbial infections [33,44]. Therefore worms defective for *sek-1* are more susceptible to infection and die earlier than wild-

type *C. elegans* animals. *Candida* strains were cultivated in liquid Sabouraud medium (Difco, BD, USA) at 35°C with shaking. One hundred μ L from this culture were inoculated on solid BHI media (Difco) containing kanamycin (90 μ g/mL) and ampicillin (200 μ g/mL) and incubated at 30°C for 24 hours. Synchronized worms in the L4 stage were added to the center of the agar plates inoculated with the yeast strains lawns and incubated for three hours at 25°C. In parallel, L4 worms were placed on agar plates containing lawns of *E. coli* OP50 strain. After the three hours incubation, worms were washed with M9 and transferred to 12-well plates with 1 mL 60% M9 buffer [45], 40% BHI, 10 μ g/mL cholesterol in ethanol, 200 μ g/mL ampicillin and 90 μ g/mL kanamycin. Around 20–30 worms were placed in each well. For antifungal efficacy, amphotericin B (1 and 2 μ g/mL), fluconazole (12 μ g/mL), voriconazole (0.25, 7.5 and 10 μ g/mL), caspofungin (2, 4 and 6 μ g/mL), or a combination of amphotericin B (1 μ g/mL) plus fluconazole (12 μ g/mL) were added to the media. Plates were incubated at 25°C and individual worm survival was monitored daily. Nematodes were considered dead when they did not respond to touching. A minimum of two independent experiments was carried out for each treatment. Images were captured with a video camera (JVC KY-F550) attached to a dissecting microscope (Leica MZ7.5).

Statistics

Graphs and Statistics analyzes were performed with Graph Pad Prism 5 (La Jolla CA, USA). Survival curves were analyzed by Log-rank (Mantel-Cox) Test and phagocytosis assays, haemocyte density, melanization quantification and fungal burden were analyzed using t-Test.

Results

Candida krusei killed *G. mellonella* in a dose dependant manner

We first investigated if *C. krusei* killed *G. mellonella*. Our results showed that *G. mellonella* is susceptible to *C. krusei* infection (Figure 1A). The death rate of the larvae depended on the yeast dose injected. Most reproducible results were found when larvae were infected with 5×10^6 *C. krusei* cells. However, *C. krusei* was less virulent than other fungi, such as *C. albicans*, which killed *G. mellonella* at lower doses (5×10^5 , Figure 1B). To confirm that the death was not a consequence of a shock due to big amounts of yeast injected in the larvae, we inoculated a group of larvae with yeast inactivated by incubation in 4% paraformaldehyde. As shown in Figure 1C, inactivated yeast did not kill *G. mellonella*, confirming that larvae death was dependent on living yeast.

To verify if *C. krusei* virulence in *G. mellonella* depended on the temperature at which the larvae are incubated, we compared virulence of *C. krusei* and *C. albicans* at different temperatures (25, 30 or 37°C). *Candida albicans* was more virulent at 37°C than at 30°C. In contrast, no statistical difference was observed in the survival of *G. mellonella* infected with *C. krusei* and incubated at the different temperatures, indicating that *C. krusei* virulence does not depend on temperature (Figure 1D). Similar findings were obtained with *C. krusei* clinical isolates (result not shown). We also studied the virulence of these two species at environmental temperature (25°C). In agreement with the previous data, we found that *C. krusei* was virulent at 25°C, while *C. albicans* virulence was significantly decreased at this temperature (data not shown). To confirm these results, we investigated if *C. krusei* growth was affected by temperature in a similar manner as *C. albicans*. So we performed growth curves of both species at 30 and 37°C. As shown in Figure 1E and F, *C. albicans* grew better at 37°C

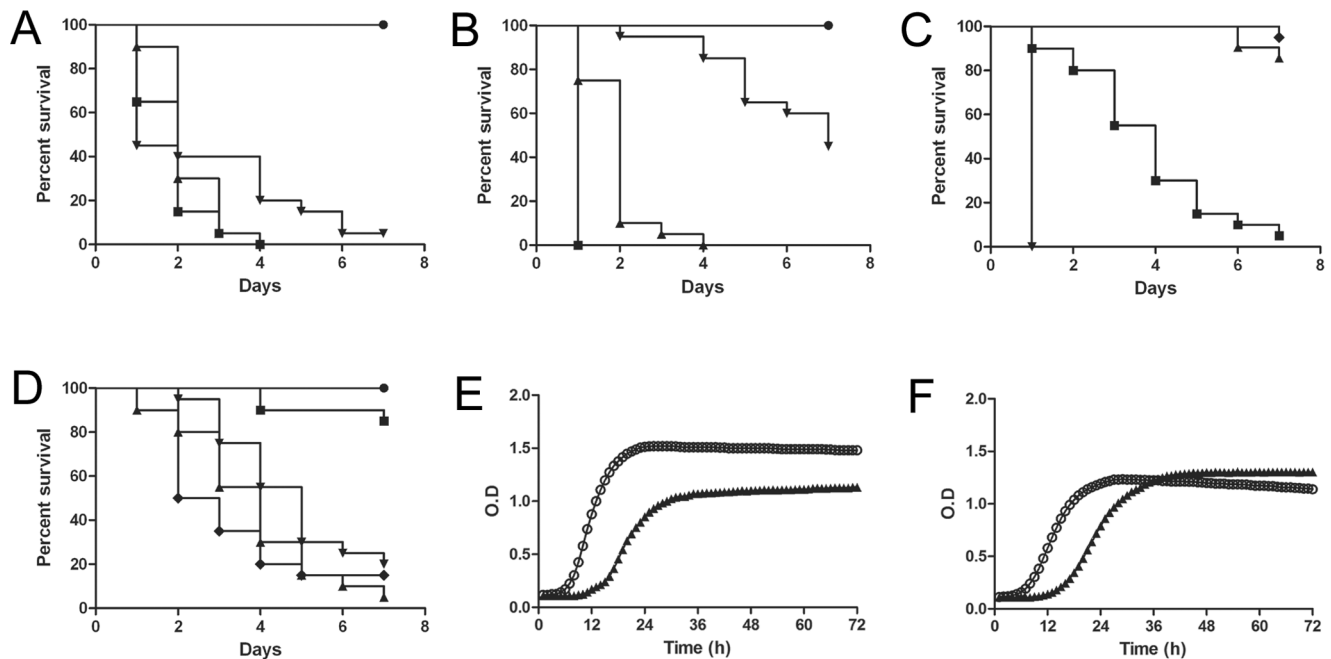


Figure 1. Comparison of the virulence of *C. krusei* and *C. albicans* in *G. mellonella*. (A) Survival curve of *G. mellonella* infected with different inocula of *C. krusei* ATCC 6258 (● PBS; ■ 10^7 cells/larva; ▲ 5×10^6 cells/larva; ▼ 2.5×10^6 cells/larva incubated at 37°C (B). Survival curve of *G. mellonella* infected with different inocula of *C. albicans* SC5314 (● PBS; ■ 10^6 cells/larva; ▲ 5×10^5 cells/larva; ▼ 10^5 cells/larvae (C) Survival of *G. mellonella* infected with inactivated yeast. Control dead cells (● PBS; ■ *C. krusei* ATCC 6258 5×10^6 cells/larva; ▲ *C. krusei* ATCC 6258 5×10^6 cells/larva (dead); ▼ *C. albicans* SC5314 10^6 cells/larva; ◆ *C. albicans* SC5314 10^6 cells/larva (dead) (D); Effect of the incubation temperature on the virulence of *C. albicans* and *C. krusei*. (E) PBS; ▲ *C. krusei* ATCC 6258 (37°C); ▼ *C. krusei* ATCC 6258 (30°C); ◆ *C. albicans* SC5314 (37°C); ■ *C. albicans* SC5314 (30°C); Growth curves of *C. albicans* (E) and *C. krusei* (F) at different temperatures. ○ 37°C; ▲ 30°C.

doi:10.1371/journal.pone.0060047.g001

compared to 30°C (two-fold reduction in generation time). In contrast, *C. krusei* grew similarly at both temperatures (0.85 fold decrease in generation time when the cells were grown at 37°C compared to 30°C). We found similar results at 25°C (data not shown), supporting that *C. krusei* growth is not affected by the incubation temperature. The final OD reached at the stationary phase at different temperatures was different with both species. *Candida albicans* reached higher OD at 37°C, which differed from the situation found in *C. krusei*, where the final OD at the stationary phase was almost identical at 30 and 37°C. Latency period was longer at 30°C, but the same trend was observed in both species (Figures 1E and 1F).

Yeast inoculation caused early melanization of the larvae

Galleria mellonella larvae appeared melanized after a few minutes of *C. krusei* injection (Figure 2A). To quantify this phenomenon, we collected the haemolymph and measured its optical density at 405 nm. When larvae were infected with 5×10^6 *C. krusei* cells, there was a significant accumulation of melanin in the haemolymph (4.3 times compared to the non-infected larvae), and this melanization increased over time (5 times at 24 hrs, Figure 2B). Clinical isolates showed a similar behavior (Figures 2C and D). We evaluated if *C. krusei* induced melanization of *G. mellonella* at lower temperatures, and we found that this phenomenon also occurred at 25°C (data not shown).

Phagocytosis and effect of *C. krusei* on haemocyte density

We examined if different *C. krusei* strains had any effect on haemocyte density. As shown in Figure 3A, *C. krusei* produced a decrease in haemocyte density in a similar manner to *C. albicans*.

We then investigated if *C. krusei* cells were phagocytosed by *G. mellonella* haemocytes. We compared the phagocytosis of this pathogen to the one measured with *C. albicans* and *C. neoformans*. The phagocytosis for all *Candida* strains (*albicans* and *krusei*) was significantly lower to the phagocytosis observed with *C. neoformans* (Figure 3B). The same result was found when phagocytosis was assessed at 25°C (data not shown).

Candida krusei can filament *in vitro*, so we investigated if this change also took place during infection in *G. mellonella*. We included *C. albicans* in these experiments as control, since it has been reported that this yeast can form hyphae in this model host [53]. As expected, *C. albicans* efficiently produced filaments in the larvae. *Candida krusei* also produced filaments, and in *G. mellonella* crude extracts they were frequently found in clumps of fat body of dark color, which we believe that are composed mainly of insect melanin. This fact may explain the fast melanization of *G. mellonella* when infected with *C. krusei*.

Antifungal efficacy during *C. krusei* infection in *G. mellonella*

One of the main features for *C. krusei* is its *in vitro* susceptibility profile. As shown in Figure 4, *C. krusei* is less susceptible to amphotericin B, voriconazole and caspofungin than *C. albicans*, and intrinsically resistant to fluconazole. So we studied if this phenotype correlated with a lack of response to the antifungal during infection in *G. mellonella*. For this purpose, we infected *G. mellonella* with *C. krusei* or *C. albicans*, and treated the larvae with different antifungals (fluconazole, voriconazole, amphotericin B and caspofungin). In the case of larvae infected with *C. krusei*, treatment with fluconazole, even at very high doses (32 or 64 mg/kg) did not increase the survival (Figures 5A and B). At higher

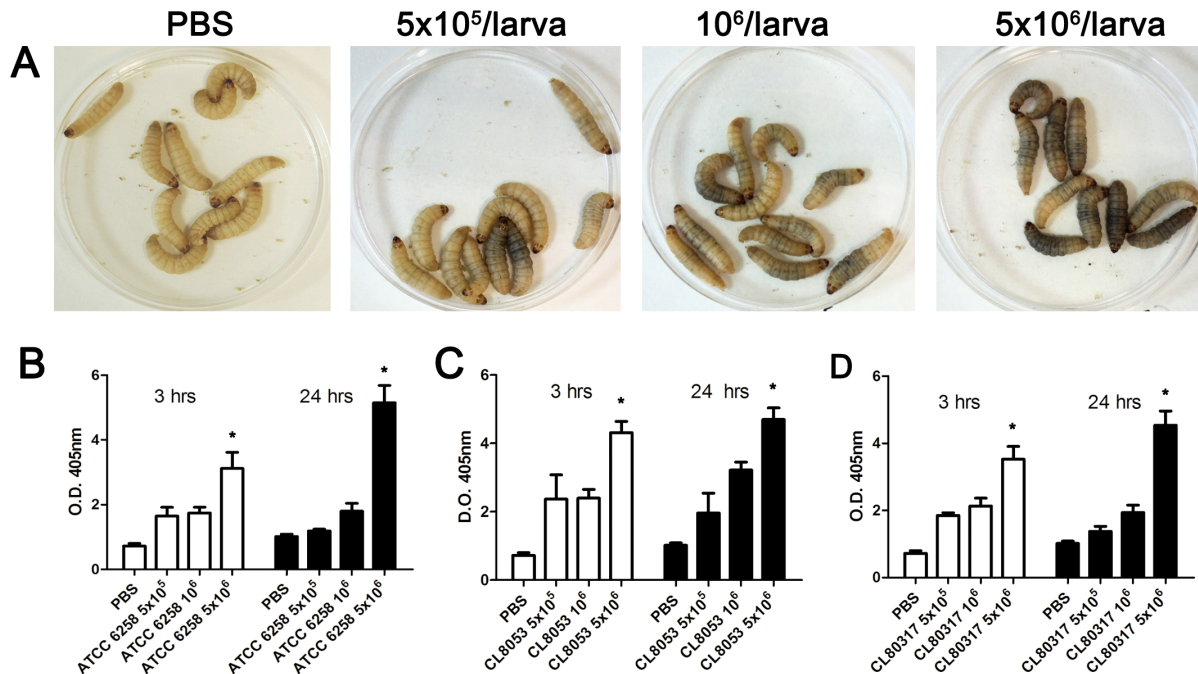


Figure 2. Melanization of *G. mellonella* infected with *C. krusei*. (A) Visual appearance of *G. mellonella* larvae infected with different *C. krusei* doses. (B, C and D) Optical Density (OD) of the haemolymph of *G. mellonella* infected with *C. krusei* ATCC 6258 (B), clinical isolate CL8053 (C) and CL80317 (D) with 5×10^5 , 10^6 , 5×10^6 cells/larva. The different size inoculum reveals dose-response melanization (* $p < 0.05$). All the experiments in this figure were performed at 37°C.
doi:10.1371/journal.pone.0060047.g002

concentrations (128 mg/kg), there was a decrease in the survival, which is explained by the toxicity of the antifungal at this high concentration, which induced 25% of death after 7 days of treatment (data not shown). When the same experiments were performed with *C. albicans*, treatment with all the fluconazole concentrations produced significant survival (Figures 5C and 5D). Concerning other azoles, *C. krusei* is considered susceptible to

voriconazole, although it presents higher MIC values to this antifungal than *C. albicans* (see Figure 4). So we studied the efficacy of voriconazole during infection in *G. mellonella*. We found that both voriconazole concentrations tested (7.5 and 10 mg/kg) protected larvae from *C. albicans* infection (Figure 6A). In contrast, larvae infected with *C. krusei* were only protected with higher

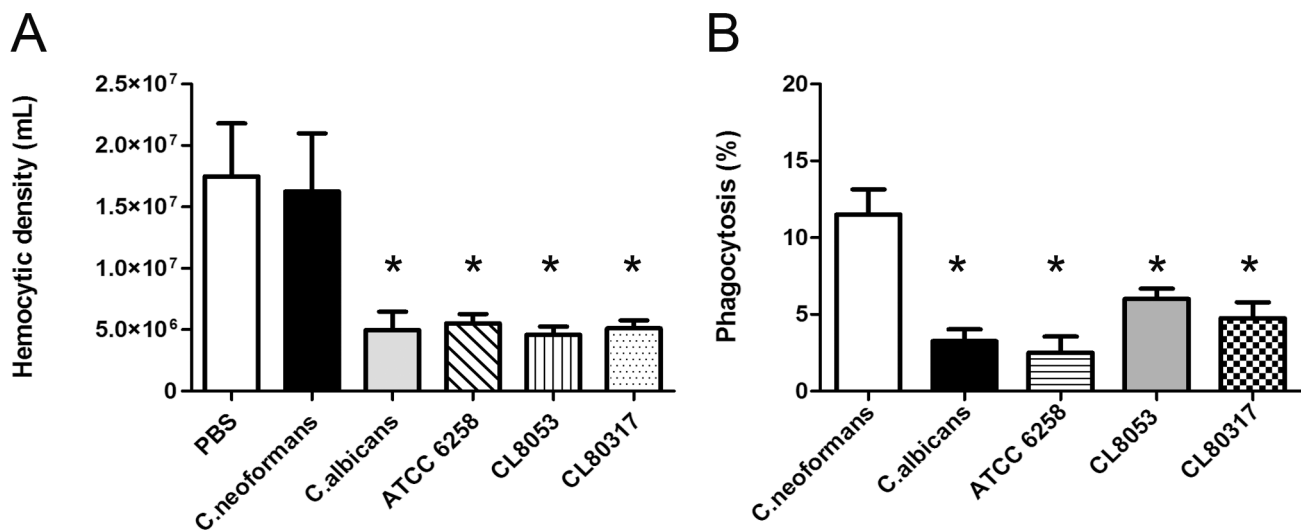
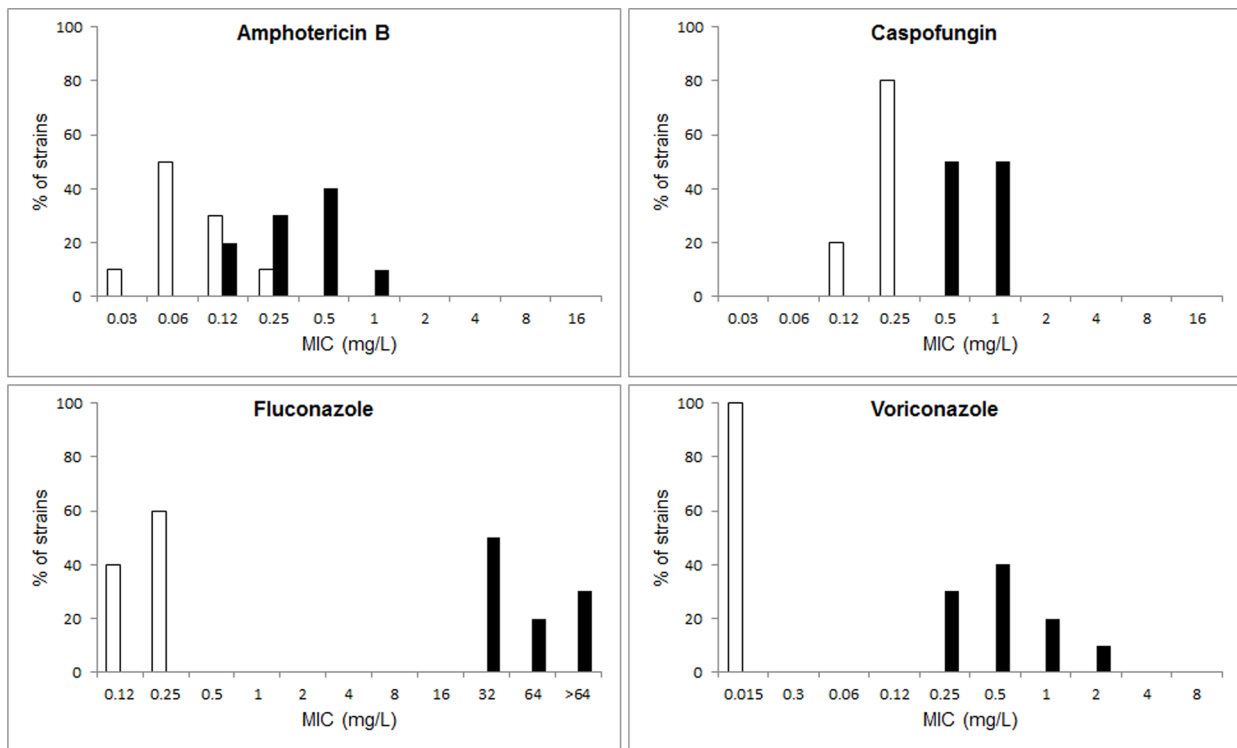


Figure 3. Interaction between *C. krusei* and haemocytes. (A) Changes in haemocyte density during *C. krusei* infection. The haemolymph of infected larvae with *C. neoformans*, *C. albicans* SC5314, *C. krusei* ATCC 6258, CL8053 and CL80317 clinical isolates and PBS was collected and the concentration of haemocytes was estimated using a haemocytometer (B). Phagocytosis percentage of *C. neoformans*, *C. albicans* SC5314, *C. krusei* ATCC 6258, CL8053 and CL80317 clinical isolates. Asterisks denote differences statistically significant ($p < 0.05$).
doi:10.1371/journal.pone.0060047.g003

A**B**

	Antifungal susceptibility (mg/L)							
	Amphotericin B		Fluconazole		Voriconazole		Caspofungin	
	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>
GM	0.08	0.33	0.18	55	0.015	0.54	0.22	0.71
Mode	0.06	0.5	0.25	32	0.015	0.5	0.25	0.5
Min	0.03	0.12	0.12	32	0.015	0.25	0.12	0.5
Max	0.25	1	0.25	>64	0.015	2	0.25	0.71

Figure 4. Antifungal susceptibility profile of *C. krusei* and *C. albicans*. A) Distribution of MIC values (n = 10) to amphotericin B, caspofungin, fluconazole and voriconazole of *C. albicans* (white bars) and *C. krusei* (black bars). B) Description of antifungal susceptibility of *C. albicans* and *C. krusei* to different antifungals. N = 10. The geometric mean (GM), mode, minimum (Min) and maximum (Max) are shown.
doi:10.1371/journal.pone.0060047.g004

voriconazole concentrations (Figure 6B). Lower doses did not have any effect on survival.

Amphotericin B (4 mg/kg) prolonged survival of larvae infected with *C. albicans* at all the concentrations tested (Figure 6A). In contrast, amphotericin B only protected larvae infected with *C. krusei* at the highest dose (4 mg/kg), which produced a 60% survival at the fourth day (Figure 6B). In a similar way, caspofungin was effective during *C. albicans* infection at all the doses tested (Figure 6C), while it only protected larvae inoculated with *C. krusei* at the highest dose (4 mg/kg) (Figure 6D). We also used an antifungal combination with fluconazole (12 or 4 mg/kg) and amphotericin B at a sub-therapeutic dose in *G. mellonella* (1 mg/kg), but we found no synergic effect between the antifungals (data not shown).

Fungal burden determination and histopathology

The fungal burden was determined by recovering the yeast cells from the larvae infected with *C. albicans* or *C. krusei* and treated with fluconazole (12 mg/kg) or amphotericin B (4 mg/kg). The

number of CFUs increased in larvae infected with both pathogens with the time of infection (Figure 7). Treatment of larvae infected with *C. albicans* with fluconazole or amphotericin B decreased the number of CFUs by 1000-fold (Figure 7A). In larvae infected with *C. krusei*, amphotericin B reduced the fungal burden by 10-fold. Curiously, fluconazole also reduced the initial fungal burden, although it did not have an effect after longer times (5 days, Figure 7B).

To complement these studies, we performed histopathology of infected and treated larvae. *Candida albicans* (Figure 8C and 8D) and *C. krusei* (Figure 8K and 8L) were found both in yeast and filament forms. The antifungal treatment with fluconazole (12 mg/kg) in larvae infected with *C. albicans* or *C. krusei* decreased the number of yeasts. Moreover, the fungi were mainly found in defined structures surrounded by *G. mellonella* cells (Figure 8E, F, M, N). Amphotericin B (4 mg/kg) had the same effect as fluconazole, although fewer yeast cells were found with this treatment (Figure 8G, H, O, P). The antifungals did not have a different effect on larvae infected with *C. albicans* or *C. krusei*.

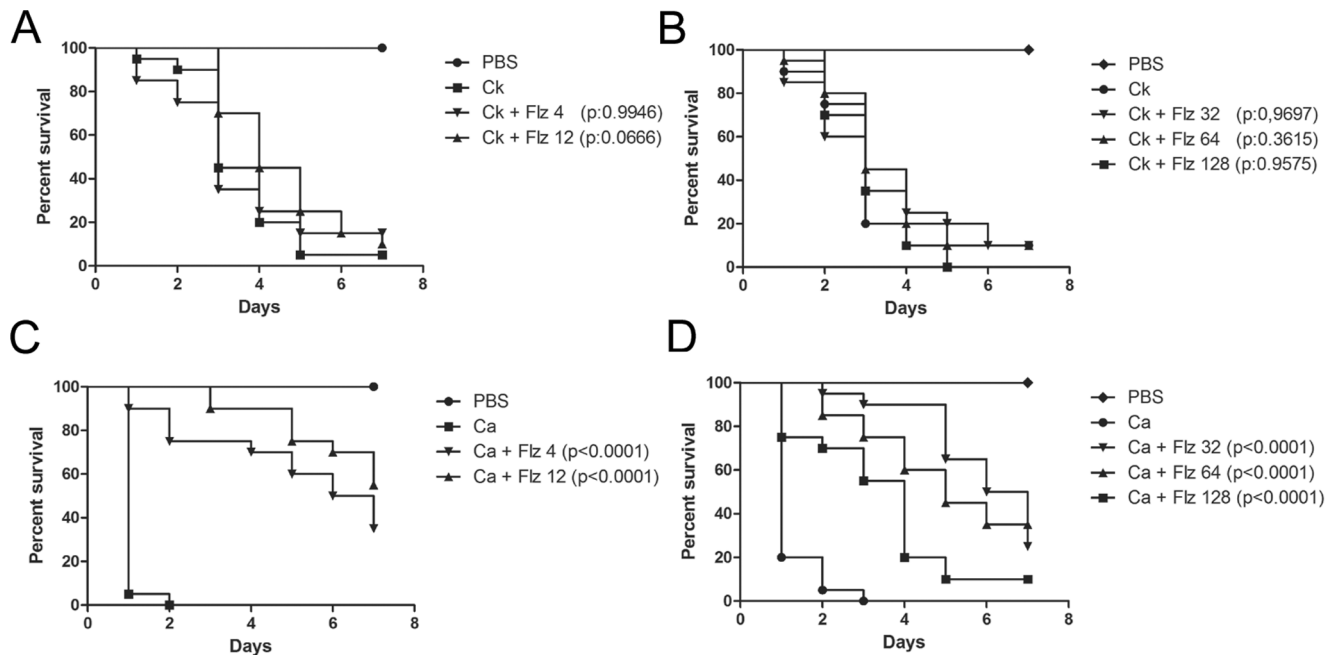


Figure 5. Efficacy of fluconazole during *G. mellonella* infection with *C. krusei* or *C. albicans*. Effect of fluconazole during infection of larvae with 5×10^6 cells of *C. krusei* (ATCC 6258) per larvae (**A and B**) and 5×10^5 cells of *C. albicans* cells (SC5314) per larva (**C and D**) in *G. mellonella*. Fluconazole treatment with 4 or 12 mg/kg (**A and C**); 32, 64 or 128 mg/kg (**B and D**). doi:10.1371/journal.pone.0060047.g005

Treatment with the antifungals alone did not have any effect on the histopathology of the larvae (result not shown).

Effects of amphotericin B and fluconazole on the physiology of *G. mellonella* during *C. albicans* and *C. krusei* infection

Antifungals have immunomodulatory properties in mammals and in *G. mellonella* [54–56]. We studied the effect of Amphotericin B (4 mg/kg) and fluconazole (12 and 64 mg/kg) on haemocyte density, melanization and phagocytosis during *G. mellonella* infection by *C. krusei* and *C. albicans*. None of the antifungal treatments influenced the haemocyte density of *C. krusei* infected larvae. However, fluconazole (64 mg/kg) reduced the haemocyte density in larvae infected with *C. albicans* by two fold ($p=0.017$, Figure 9A).

None of the antifungals had a significant effect on the melanization of larvae infected with *C. krusei*. In contrast, antifungal treatment of larvae infected with *C. albicans* reduced melanization after 24 hours of infection. Fluconazole (64 mg/kg) and amphotericin B (4 mg/kg) reduced the melanization of these larvae by 1.8 ($p=0.0139$) and 1.5 fold, respectively ($p=0.003$, Figure 9B). No differences were observed in melanization or phagocytosis after 3 hours of infection with *C. albicans* or *C. krusei*. Antifungal drugs alone did not cause any effect in *G. mellonella* on the parameters analyzed.

Virulence and antifungal efficacy in *C. elegans* model

The nematode *C. elegans* is another non mammalian model that has been used as a host to study microbial virulence in this study. We also used this model to evaluate the *in vivo* protection of antifungals during *C. krusei* infection such as amphotericin B, fluconazole, voriconazole, caspofungin, and a combination of amphotericin B plus fluconazole. *Candida albicans* and *C. krusei* both killed *C. elegans* worms. In both *Candida* strains, worm death was

associated with filamentation of the yeast in the worms (Figure 10A). When we investigated the protection of the different antifungal treatments, we found that all the antifungals protected during *C. albicans* infection at all the concentrations tested (Figure 10B). In contrast, in nematodes infected with *C. krusei*, the behavior of the antifungals was different: amphotericin B only protected at concentrations $\geq 2 \mu\text{g/mL}$ and fluconazole was not protective at any of the concentrations used (Figure 10C). Caspofungin showed similar protection as the one observed when the worms were infected with *C. albicans* (Figure 10C). The antifungal combination of fluconazole (12 $\mu\text{g/mL}$) and amphotericin B (1 $\mu\text{g/mL}$) did not show any synergistic effect in this model (result not shown). We also studied how voriconazole protected the worms from infection. As shown in Figure 10D, all the concentrations used (0.25, 7.5 and 10 mg/L) protected larvae from infection by *C. albicans*. However, only the higher doses (7.5 and 10 mg/L) showed efficacy during *C. krusei* infection, while the lowest dose (0.25 mg/L) was not protective.

Discussion

The use of invertebrate hosts to study the virulence of microbial pathogens presents advantages over conventional mammals. Amoebae, nematodes and insect hosts are good models to study virulence and to elucidate host–pathogen interaction. Ethical issues, cost and faster results are other benefits of these models [41,42,57]. During evolution, non vertebrate animals have developed immunity against microbial pathogens [42], and for this reason, there are functional and structural similarities between the innate immune system of mammals and insects. So, these models can be used to study immune responses [57].

In this work, we have used two different hosts, *G. mellonella* and *C. elegans*, to investigate virulence of *C. krusei* and antifungal efficacy. Compared to other non-conventional models, *G. mellonella* allows the use of precise pathogen doses by injection, low cost and

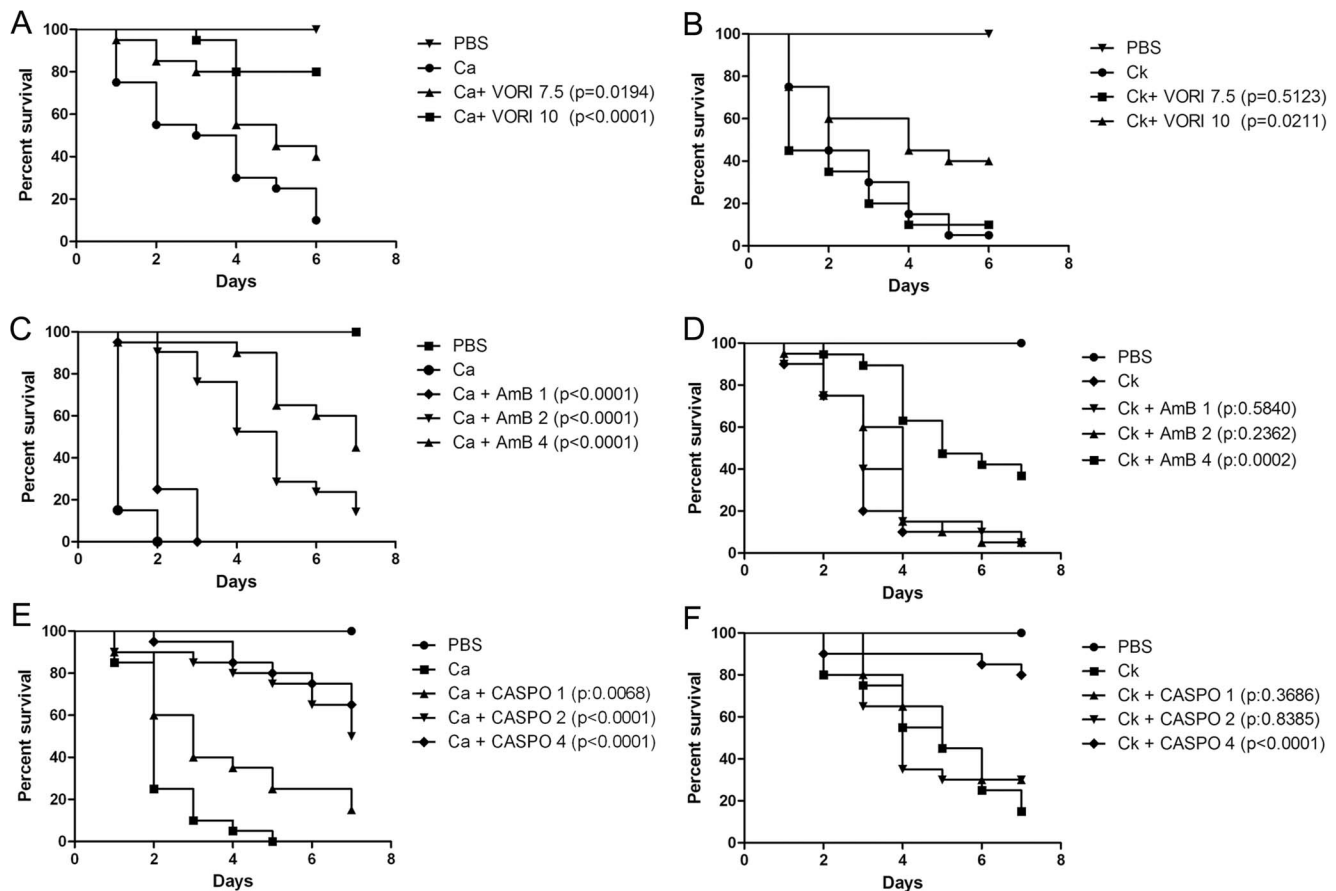


Figure 6. Efficacy of voriconazole, amphotericin B or caspofungin during *C. krusei* and *C. albicans* infection in *G. mellonella*. **A and B)** Voriconazole treatment efficacy (7 and 10 mg/kg) in *G. mellonella* infected with *C. albicans* SC5314 (**A**) or *C. krusei* ATCC 6258 (**B**). **C and D)** Amphotericin B treatment efficacy (1, 2, 4 mg/kg) in *G. mellonella* infected with *C. albicans* SC5314 (**C**) or *C. krusei* ATCC 6258 (**D**). **E and F)** Caspofungin treatment efficacy (1, 2, 4 mg/kg) in *G. mellonella* infected with *C. albicans* SC5314 (**E**) or *Candida krusei* ATCC 6258 (**F**). In all the cases, the larvae were infected with 5×10^5 *C. albicans* cells/larva and 5×10^6 *C. krusei* cells/larva. doi:10.1371/journal.pone.0060047.g006

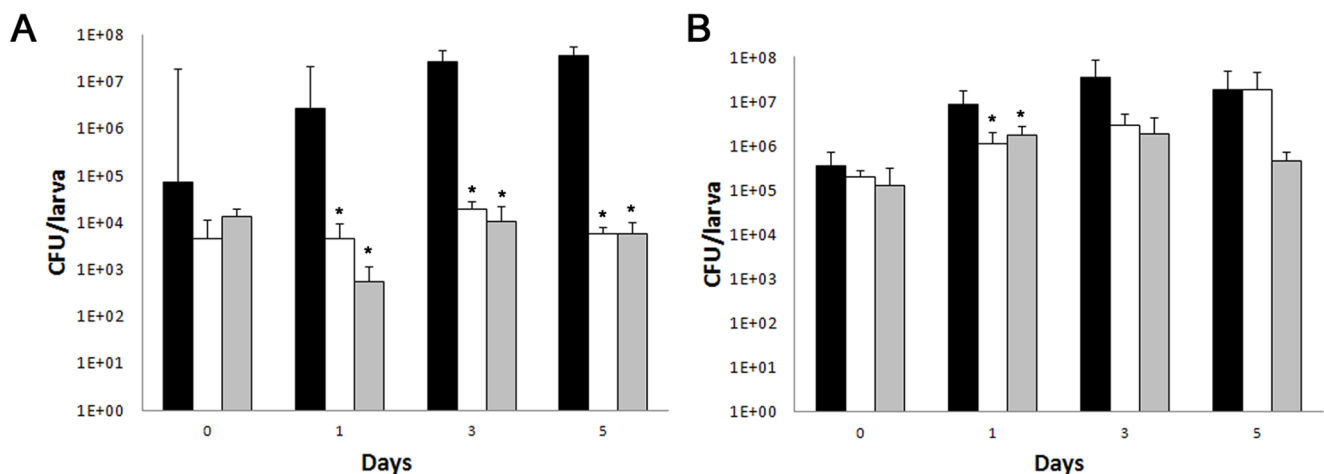


Figure 7. Effect of antifungal treatment on fungal burden in *G. mellonella* infected with *C. albicans* or *C. krusei*. *Galleria mellonella* larvae were infected with *C. krusei* ATCC 6258 (**A**, 5×10^6 cells/larva) or *C. albicans* SC5314 (**B**, 5×10^5 cells/larva) and CFUs recovered from *G. mellonella*. Black bars, no treatment, white bars, fluconazole (12 mg/kg), grey bars, amphotericin B (4 mg/kg). doi:10.1371/journal.pone.0060047.g007

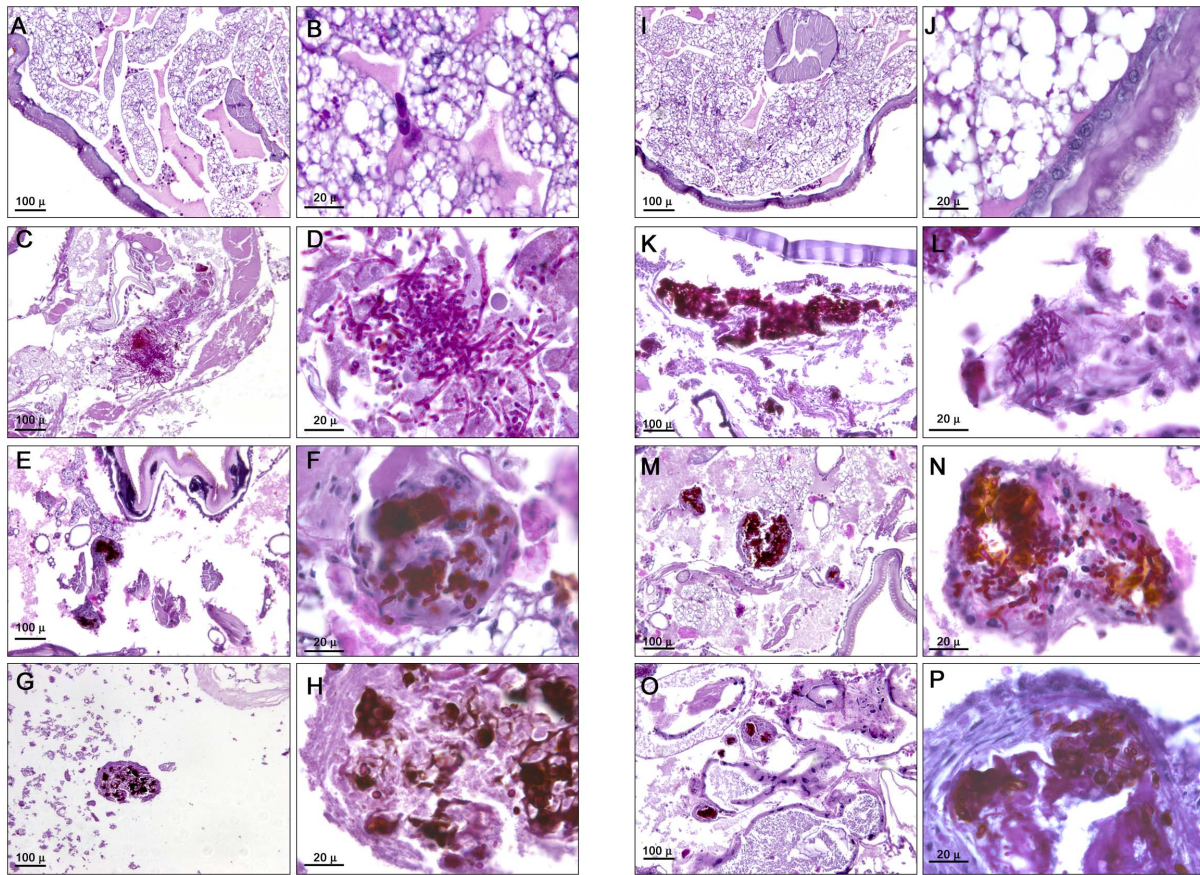


Figure 8. Histopathology of *G. mellonella* infected with *C. krusei* and *C. albicans* and treated with different antifungals. *Galleria mellonella* was infected with 5×10^5 cells/larva of *C. albicans* SC5314 (C–H), or with 5×10^6 cells/larva of *C. krusei* ATCC 6258 (K–P). After 96 hours of infection, larvae were processed for histopathology as described in Material and Methods. (A, B, I, J), uninfected controls; (C, D, K and L), untreated controls; (E, F, M and N), larvae treated with fluconazole (12 mg/kg); (G, H, O and P), larvae treated with amphotericin B (4 mg/kg). (A, C, E, G, I, K, M, O), low magnification; (B, D, F, H, J, L, N and P), high magnification.
doi:10.1371/journal.pone.0060047.g008

evaluation of survival at different temperatures. The virulence of five *C. albicans* strains with mutations in genes related to filamentation was evaluated in *G. mellonella* and it was demon-

strated that this model is useful as a filamentation assay [53]. In the case of *C. neoformans*, the virulence of different isolates, morphogenesis and antifungal treatments in *G. mellonella* showed good

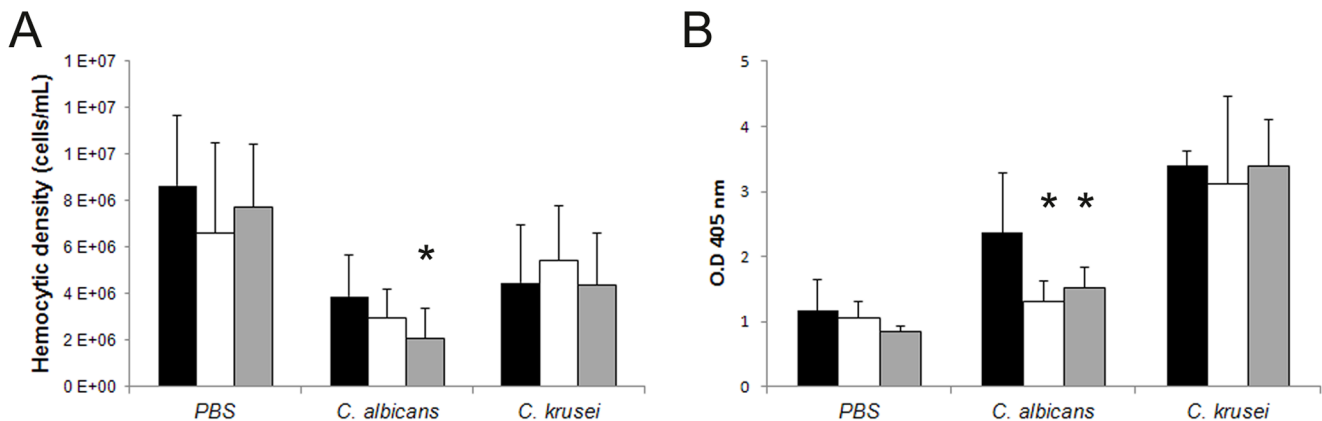


Figure 9. Effect of antifungal treatment of haemocyte density and melanization of *G. mellonella* infected with *C. krusei* or *C. albicans*. (A) Hemocytic density of *G. mellonella* infected with *C. albicans* SC5314 or *C. krusei* ATCC 6258 treated with amphotericin B (4 mg/kg) or fluconazole (64 mg/kg). (B) Optical Density (OD) of the haemolymph of *G. mellonella* infected with *C. albicans* or *C. krusei* treated with amphotericin B (4 mg/kg) or with fluconazole (64 mg/kg). Black bars, no treatment; grey bars, fluconazole; white bars, amphotericin B. * $p < 0.05$.
doi:10.1371/journal.pone.0060047.g009

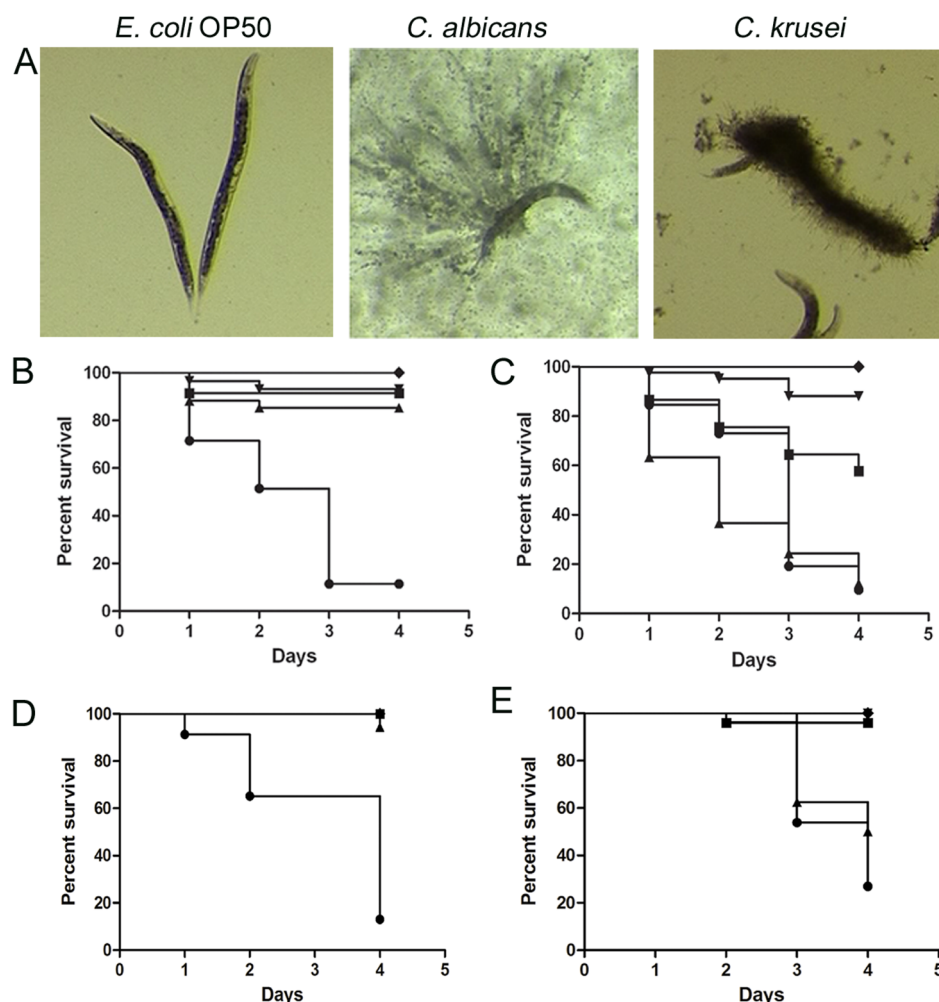


Figure 10. Virulence of *C. krusei* and *C. albicans* in *C. elegans* and antifungal efficacy. *Caenorhabditis elegans* was infected as described in material and methods with *C. krusei* (ATCC 6258), *C. albicans* (SC5314) and *E. coli* OP50. (A) Visual appearance of infected worms (50× magnification). (B) Antifungal efficacy in *C. elegans* infected with *C. albicans*. ♦ OP50, ● *C. albicans*, ■ *C. albicans* and treated with 2 µg/mL amphotericin B ($p < 0.0001$), ▲ Fluconazole 12 µg/mL ($p < 0.0001$); ▼ Caspofungin 2 µg/mL ($p < 0.0001$). (C) Antifungal efficacy during *C. krusei* infection ♦ OP50; ● *C. krusei*; ■ *C. krusei* treated with amphotericin B 2 µg/mL; ($p < 0.0001$); ▲ Fluconazole 12 µg/mL ($p = 0.1207$); ▼ Caspofungin 2 µg/mL ($p < 0.0001$). (D) Effect of voriconazole on survival of *C. elegans* worms infected with *C. albicans* (●, *C. albicans*, ▲, voriconazole 0.25 mg/L ($p < 0.0001$); ■, voriconazole, 7.5 mg/L ($p < 0.0001$); ▼ voriconazole 10 mg/L ($p < 0.0001$)). (E), Efficacy of voriconazole during infection of *C. elegans* by *C. krusei* (● *C. krusei*; ▲ voriconazole 0.25 mg/L ($p = 0.1217$); ▼ voriconazole 7.5 mg/L ($p < 0.0001$); ■ voriconazole 10 mg/L ($p < 0.0001$)). doi:10.1371/journal.pone.0060047.g010

correlation with mammalian system [57,58]. Previous work demonstrated that *C. elegans* is susceptible to different *Candida* species. For that reason, this host has been used to look for new compounds with antifungal activity [44,46]. Besides, the available *C. elegans* mutant animals defective in signaling pathways involved in the immune system allows the study of the molecular mechanisms of host-pathogen interaction [59]. However, there are also some cases in which there is no correlation between virulence in mammals and *G. mellonella* [60], so further studies are required to validate the use of these models.

For these reasons, *C. krusei* offers a good model to validate the use of invertebrate models. This yeast shows reduced virulence in mammalian systems and fungal burden is significantly lower in animals infected with *C. krusei* than in animals infected with other fungal pathogens, such as *C. albicans* [61], so it is possible to compare its virulence with other highly virulent yeasts. Moreover, *C. krusei* is intrinsically resistant to fluconazole, so it offers an excellent model to correlate antifungal efficacy *in vitro* and *in vivo*.

Previous work showed that *G. mellonella* infected with 2×10^6 cells/larva of *C. krusei* killed 20% of the larvae after 72 hrs [62]. In our work, we have reproduced the model and observed that larvae killing can be faster by increasing the pathogen concentration. However, *C. krusei* was less virulent than *C. albicans* because the amount of yeast required to cause 100% death on the fourth day was 10 times higher. This is also in agreement with the reduced virulence of *C. krusei* in mammalian models [63,64], but also indicates that *G. mellonella* offers a simple method to study virulence traits of *C. krusei*. This finding is of particular interest, since not every microorganism (i.e., *Pneumocystis murina*) can cause disease in *G. mellonella* [65].

The possibility to incubate *G. mellonella* at different temperatures is one of the best advantages of this model because it permits to study virulence at both environment and mammalian temperatures. The virulence of some pathogenic microorganisms (such as *Cryptococcus neoformans*, *Fusarium* spp and *Acinetobacter baumannii*) in *G. mellonella* is affected by the incubation temperature of the larvae

after inoculation [66,67]. In contrast, no statistical difference in the virulence of *C. krusei* was observed between the two temperatures. This correlates with the growth rate of *C. krusei* at both temperatures. In contrast to *C. albicans*, *C. krusei* growth was less affected by the temperature. Interestingly, *G. mellonella* seems to better tolerate environmental temperature than physiological temperature, and it would be expected that immunity is impaired at high temperature. However, our data indicate that in the case of fungi with reduced virulence, immunity at high temperature can control infection, and virulence of the fungus is more dependent on virulence traits of the yeast. *Candida krusei* and *C. albicans* produced filaments in *G. mellonella*, although the morphology was different. *Candida krusei* tended to form cell aggregates with melanization, characteristic of encapsulation. This result indicates that *G. mellonella* differentially recognizes pathogenic yeasts, which can be related to the different virulence exhibited by these two *Candida* species.

Decrease in the amount of haemocytes has been associated with increased susceptibility to fungal infections [39]. *Candida krusei* induced a reduction in the proportion of haemocytes in a similar way as *C. albicans*. This result suggests a mechanism of phagocytosis avoidance by which *Candida* species induce killing of *G. mellonella*, but does not explain the difference in virulence shown by the different *Candida* spp. This reduction might be a consequence of haemocyte explosion after filamentation of these yeasts after internalization. Interestingly, *Cryptococcus neoformans* does not cause a reduction in the number of hemocytes in the first two hours post-infection [58,66], which might correlate with the fact that this fungus is an intracellular pathogen and can survive in phagocytic cells without affecting their viability [68,69]. In addition, haemocytes are recruited at infection sites to form clumps or nodules [38,70], so it is also possible that a proportion of the haemocytes migrate from the haemolymph to the infection sites. In agreement with our findings, it has been described that *C. albicans* induced a reduction in the concentration of haemocytes. In contrast, larvae infected with *S. cerevisiae* showed higher survival and haemocytic concentration [39]. Moreover, the compound [Ag2 (mal) (phen3)] increased the survival of larvae infected with *C. albicans*, and also increased the haemocytic concentration [71]. Phagocytosis of *C. krusei* and *C. albicans* was also lower compared to other fungi, such as *C. neoformans*. There are several mechanisms that could account for this phenomenon. *Candida* spp might be poorly phagocytosed due to impaired pathogen recognition by insect haemocytes. In addition to the reduction of haemocyte density and haemocyte explosion after filament formation discussed above could also explain the reduced phagocytosis observed. The future development of *in vitro* models to study yeast-haemocyte interaction will be of great help to fully characterize these phenomena.

Melanization is a humoral response of the insect that is catalyzed by the enzyme phenoloxidase, and the reaction occurs through the formation of capsules that surround foreign particles [72]. We observed a fast melanization process after infection with *C. krusei*. The degree of melanization depended on the inoculum concentration, but not on the viability of the cells, indicating that melanization is an unspecific process that depends on the presence of foreign particles.

One of the main findings of our work is the correlation between the *in vivo* efficacy of antifungals during *C. albicans* and *C. krusei* infection and their *in vitro* susceptibility profiles. Fluconazole did not have any protective effect during *C. krusei* infection in both *G. mellonella* and *C. elegans* models. Similar findings have been obtained with protection in immunosuppressed mice [63,73], which validates the use of non-mammalian models to study

antifungal efficacy. Due to the simplicity of these models, we believe that these hosts offer suitable and reliable systems to evaluate antifungal efficacy *in vivo*. In this sense, *C. elegans* has been successfully used to perform high-throughput assays to evaluate fungal susceptibility to different types of compounds [46,74–76]. However, more information with resistant strains is required to fully validate their use. We also noticed differences in the protection between *C. albicans* and *C. krusei* *in vivo* after treatment with voriconazole, amphotericin B and caspofungin. During *C. krusei* infection, the caspofungin and amphotericin B concentrations required for protection were always higher than during *C. albicans* infection. Although *C. krusei* is considered susceptible to the three drugs, it has reduced susceptibility to caspofungin and amphotericin B compared to *C. albicans* [20,77,78]. So our data are again in agreement with the different susceptibility profile shown by these species *in vitro*. While several articles suggest molecular mechanisms for the resistance to fluconazole exhibited by *C. krusei*, it is not known why this species is less susceptible to amphotericin B and caspofungin than *C. albicans*. The survival experiments correlated with the fungal burden observed in the larvae. Reduction of the fungal burden was very significant during *C. albicans* with all the antifungals. In contrast, in larvae infected with *C. krusei*, fluconazole had no effect on CFUs and the effect of amphotericin B was less pronounced than in larvae inoculated with *C. albicans*. These data indicate that larvae response is less dynamic during *C. krusei* infection, which poses a limitation to perform pharmacodynamic studies in this infection model. Similar findings have been found in mammalian models. In immunosuppressed mice, fluconazole does not protect during *C. krusei* infection and amphotericin B had a partial effect, while anidulafungin treatment resulted in almost full survival of the animals [79]. In agreement, in another study, fluconazole had a very moderate effect in reducing fungal burden in neutropenic mice compared to other azoles, such as isavuconazole [64]. The use of antifungal combinations has not been sufficiently explored to study the pharmacodynamics response during *C. krusei* infection, and we believe that non mammalian models might offer a simple and easy procedure to evaluate this important issue.

Caenorhabditis elegans is also useful to test antifungal efficacy against several pathogenic fungi, including *Candida* spp and *Fusarium* spp [44,80]. We found very similar results with *C. elegans*, and these results are comparable with the ones found in *G. mellonella*. This finding is important in the context of our work, because we have been able to reproduce very similar results using two different and independent host models. Despite the differences in the immune responses between nematodes and insects, *C. krusei* and *C. albicans* were virulent in both hosts. These results strongly support the use of these hosts as screening models. Interestingly, we could not find significant differences in the virulence of these species in *C. elegans*, in contrast to the results found in *G. mellonella*, where *C. albicans* was more virulent than *C. krusei*. We believe that this difference between the behavior of the different yeast species in *G. mellonella* and *C. elegans* is the temperature at which the virulence experiments are performed, which is significantly lower in *C. elegans*.

Understanding fungal pathogenesis and the antifungal discovery are key aspects in medical mycology. Non-conventional models represent an important alternative for *in vivo* studies, even in the case of organisms that present low virulence in mammalian systems, such as *C. krusei*. Our results also demonstrate the feasibility of non-mammalian models to identify new antifungal compounds against resistant species. The correlation of the virulence of pathogenic fungi in mammals and non-mammalian models is still unclear. However, there is increasing evidence that

some virulence phenotypes are reproduced in invertebrate models. For this reason, we believe that more studies to validate the full use of these hosts are required in the future.

Acknowledgments

We thank Raquel Pérez Tavárez for the histology experiments.

References

- Pfaller MA, Diekema DJ (2007) Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 20: 133–163.
- Almirante B, Rodriguez D, Park BJ, Cuenca-Estrella M, Planes AM, et al. (2005) Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol* 43: 1829–1835.
- Chen S, Slavin M, Nguyen Q, Marriott D, Playford EG, et al. (2006) Active surveillance for candidemia, Australia. *Emerg Infect Dis* 12: 1508–1516.
- Labelle AJ, Micek ST, Roubinian N, Kollef MH (2008) Treatment-related risk factors for hospital mortality in *Candida* bloodstream infections. *Crit Care Med* 36: 2967–2972.
- Pfaller MA, Diekema DJ (2010) Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Crit Rev Microbiol* 36: 1–53.
- Colombo AL, Tobón A, Restrepo A, Queiroz-Telles F, Nucci M (2011) Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. *Med Mycol* 49: 785–798.
- Warnock DW (2006) Fungal diseases: an evolving public health challenge. *Med Mycol* 44: 697–705.
- Shorr AF, Gupta V, Sun X, Johannes RS, Spalding J, et al. (2009) Burden of early-onset candidemia: analysis of culture-positive bloodstream infections from a large U.S. database. *Crit Care Med* 37: 2519–2526; quiz 2535.
- Eggimann P, Garbino J, Pittet D (2003) Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis* 3: 685–702.
- Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouer SA, Arthington-Skaggs B, et al. (2006) Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J Clin Microbiol* 44: 2816–2823.
- Shao PL, Huang LM, Hsueh PR (2007) Recent advances and challenges in the treatment of invasive fungal infections. *Int J Antimicrob Agents* 30: 487–495.
- Pemán J, Salavert M (2012) General epidemiology of invasive fungal disease. *Enferm Infect Microbiol Clin* 30: 90–98.
- Arendrup MC (2010) Epidemiology of invasive candidiasis. *Curr Opin Crit Care* 16: 445–452.
- Peman J, Canton E, Quindos G, Eraso E, Alcoba J, et al. (2012) Epidemiology, species distribution and in vitro antifungal susceptibility of fungaemia in a Spanish multicentre prospective survey. *J Antimicrob Chemother* 67: 1181–1187.
- Trick WE, Fridkin SK, Edwards JR, Hajjeh RA, Gaynes RP (2002) Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989–1999. *Clin Infect Dis* 35: 627–630.
- Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Nagy E, et al. (2008) *Candida krusei*, a multidrug-resistant opportunistic fungal pathogen: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. *J Clin Microbiol* 46: 515–521.
- Horn DL, Neofytos D, Anaissie EJ, Fishman JA, Steinbach WJ, et al. (2009) Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *Clin Infect Dis* 48: 1695–1703.
- Miceli MH, Diaz JA, Lee SA (2011) Emerging opportunistic yeast infections. *Lancet Infect Dis* 11: 142–151.
- Rodríguez-Tudela JL, Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Donnelly JP, Lass-Flörl C (2010) EUCAST breakpoints for antifungals. *Drug News Perspect* 23: 93–97.
- Abbas J, Bodey GP, Hanna HA, Mardani M, Girgawy E, et al. (2000) *Candida krusei* fungemia. An escalating serious infection in immunocompromised patients. *Arch Intern Med* 160: 2659–2664.
- Fukuoka T, Johnston DA, Winslow CA, de Groot MJ, Burt C, et al. (2003) Genetic basis for differential activities of fluconazole and voriconazole against *Candida krusei*. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 1213–1219.
- Pappas PG, Rex JH, Sobel JD, Filler SG, Dismukes WE, et al. (2004) Guidelines for treatment of candidiasis. *Clin Infect Dis* 38: 161–189.
- Spanakis EK, Aperis G, Mylonakis E (2006) New agents for the treatment of fungal infections: clinical efficacy and gaps in coverage. *Clin Infect Dis* 43: 1060–1068.
- Venkateswarlu K, Denning DW, Manning NJ, Kelly SL (1996) Reduced accumulation of drug in *Candida krusei* accounts for itraconazole resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 2443–2446.
- Orozco AS, Higginbotham LM, Hitchcock CA, Parkinson T, Falconer D, et al. (1998) Mechanism of fluconazole resistance in *Candida krusei*. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 2645–2649.
- Pemán J, Cantón E, Orero A, Viudes A, Frasquet J, et al. (2002) Epidemiology of candidemia in Spain - Multicenter study. *Rev Iberoam Micol* 19: 30–35.
- Muñoz P, Sánchez-Somolinos M, Alcalá L, Rodríguez-Crèixems M, Peláez T, et al. (2005) *Candida krusei* fungaemia: antifungal susceptibility and clinical presentation of an uncommon entity during 15 years in a single general hospital. *J Antimicrob Chemother* 55: 188–193.
- Rogers TR (2006) Antifungal drug resistance: limited data, dramatic impact? *Int J Antimicrob Agents* 27 Suppl 1: 7–11.
- Rodríguez-Tudela JL, Alcazar-Fuoli L, Cuesta I, Alastruey-Izquierdo A, Monzon A, et al. (2008) Clinical relevance of resistance to antifungals. *Int J Antimicrob Agents* 32 Suppl 2: S111–113.
- Colombo AL, Ngai AL, Bourque M, Bradshaw SK, Strohmaier KM, et al. (2010) Caspofungin use in patients with invasive candidiasis caused by common non-albicans *Candida* species: review of the caspofungin database. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 1864–1871.
- Steenbergen JN, Shuman HA, Casadevall A (2001) *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 15245–15250.
- Steenbergen JN, Nosanchuk JD, Malliaris SD, Casadevall A (2003) *Cryptococcus neoformans* virulence is enhanced after growth in the genetically malleable host *Dictyostelium discoideum*. *Infect Immun* 71: 4862–4872.
- Mylonakis E, Ausubel FM, Perfect JR, Heitman J, Calderwood SB (2002) Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Cryptococcus neoformans* as a model of yeast pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 15675–15680.
- Glavis-Bloom J, Muhammed M, Mylonakis E (2012) Of model hosts and man: using *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* and *Galleria mellonella* as model hosts for infectious disease research. *Adv Exp Med Biol* 710: 11–17.
- Alarco AM, Marcil A, Chen J, Suter B, Thomas D, et al. (2004) Immune-deficient *Drosophila melanogaster*: a model for the innate immune response to human fungal pathogens. *J Immunol* 172: 5622–5628.
- Fallon AM, Sun D (2001) Exploration of mosquito immunity using cells in culture. *Insect Biochem Mol Biol* 31: 263–278.
- Boman HG, Hultmark D (1987) Cell-free immunity in insects. *Annu Rev Microbiol* 41: 103–126.
- Kavanagh K, Reeves EP (2004) Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev* 28: 101–112.
- Bergin D, Brennan M, Kavanagh K (2003) Fluctuations in haemocyte density and microbial load may be used as indicators of fungal pathogenicity in larvae of *Galleria mellonella*. *Microbes Infect* 5: 1389–1395.
- Fuchs BB, O'Brien E, Khoury JB, Mylonakis E (2010) Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. *Virulence* 1: 475–482.
- Deslormes A, Fuchs BB, Mylonakis E (2012) Selecting an invertebrate model host for the study of fungal pathogenesis. *PLoS Pathog* 8: e1002451.
- Fuchs BB, Mylonakis E (2006) Using non-mammalian hosts to study fungal virulence and host defense. *Curr Opin Microbiol* 9: 346–351.
- Mahajan-Miklos S, Tan MW, Rahme LG, Ausubel FM (1999) Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell* 96: 47–56.
- Breger J, Fuchs BB, Aperis G, Moy TI, Ausubel FM, et al. (2007) Antifungal chemical compounds identified using a *C. elegans* pathogenicity assay. *PLoS Pathog* 3: e18.
- Tampakakis E, Okoli I, Mylonakis E (2008) A *C. elegans*-based, whole animal, in vivo screen for the identification of antifungal compounds. *Nat Protoc* 3: 1925–1931.
- Okoli I, Coleman JJ, Tampakakis E, Tampakakis E, An WF, et al. (2009) Identification of antifungal compounds active against *Candida albicans* using an improved high-throughput *Caenorhabditis elegans* assay. *PLoS One* 4: e7025.
- Gillum AM, Tsay EY, Kirsch DR (1984) Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* ura3 and *E. coli* pyrF mutations. *Mol Genet* 198: 179–182.
- Rodríguez-Tudela JL, Arendrup M, Barchiesi F, Bille J, Chrysanthou E, et al. (2008) EUCAST definitive document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect* 14: 398–405.
- Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C, Hope W (2012) EUCAST technical note on the EUCAST definitive document EDef 7.2: method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts EDef 7.2 (EUCAST-AFST). *Clin Microbiol Infect* 18: E246–247.
- Alvarado-Ramirez E, Torres-Rodriguez JM, Sellart M, Vidotto V (2008) Laccase activity in *Cryptococcus gattii* strains isolated from goats. *Rev Iberoam Micol* 25: 150–153.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: LS MPL EL MCE MJMG OZ. Performed the experiments: LS MPL ACMA EL. Analyzed the data: LS MPL ACMA EL OZ. Contributed reagents/materials/analysis tools: EL MCE OZ. Wrote the paper: LS MPL ACMA AMFA EL MCE MJMG OZ.

51. Williamson PR (1994) Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: identification as a laccase. *J Bacteriol* 176: 656–664.
52. Sulston J, Hodgkin J (1988) The Nematode *Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
53. Fuchs BB, Eby J, Nobile CJ, El Khoury JB, Mitchell AP, et al. (2010) Role of filamentation in *Galleria mellonella* killing by *Candida albicans*. *Microbes Infect* 12: 488–496.
54. Ben-Ami R, Lewis RE, Kontoyiannis DP (2008) Immunocompromised hosts: immunopharmacology of modern antifungals. *Clin Infect Dis* 47: 226–235.
55. Kelly J, Kavanagh K (2011) Caspofungin primes the immune response of the larvae of *Galleria mellonella* and induces a non-specific antimicrobial response. *J Med Microbiol* 60: 189–196.
56. Mesa-Arango AC, Scorroni L, Zaragoza O (2012) It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. *Frontiers in Microbiology* 3: 286.
57. Mylonakis E, Casadevall A, Ausubel FM (2007) Exploiting amoeboid and non-vertebrate animal model systems to study the virulence of human pathogenic fungi. *PLoS Pathog* 3: e101.
58. García-Rodas R, Casadevall A, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Zaragoza O (2011) *Cryptococcus neoformans* capsular enlargement and cellular gigantism during *Galleria mellonella* infection. *PLoS One* 6: e24485.
59. Pukkila-Worley R, Ausubel FM, Mylonakis E (2011) *Candida albicans* infection of *Caenorhabditis elegans* induces antifungal immune defenses. *PLoS Pathog* 7: e1002074.
60. Jackson JC, Higgins LA, Lin X (2009) Conidiation color mutants of *Aspergillus fumigatus* are highly pathogenic to the heterologous insect host *Galleria mellonella*. *PLoS One* 4: e4224.
61. Arendrup M, Horn T, Frimodt-Møller N (2002) In vivo pathogenicity of eight medically relevant *Candida* species in an animal model. *Infection* 30: 286–291.
62. Cotter G, Doyle S, Kavanagh K (2000) Development of an insect model for the in vivo pathogenicity testing of yeasts. *FEMS Immunol Med Microbiol* 27: 163–169.
63. Karyotakis NC, Anaissie EJ, Hachem R, Dignani MC, Samonis G (1993) Comparison of the efficacy of polyenes and triazoles against hematogenous *Candida krusei* infection in neutropenic mice. *J Infect Dis* 168: 1311–1313.
64. Majithiya J, Sharp A, Parmar A, Denning DW, Warn PA (2009) Efficacy of isavuconazole, voriconazole and fluconazole in temporarily neutropenic murine models of disseminated *Candida tropicalis* and *Candida krusei*. *J Antimicrob Chemother* 63: 161–166.
65. Fuchs BB, Bishop LR, Kovacs JA, Mylonakis E (2011) *Galleria mellonella* are resistant to *Pneumocystis murina* infection. *Mycopathologia* 171: 273–277.
66. Mylonakis E, Moreno R, El Khoury JB, Idnurm A, Heitman J, et al. (2005) *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Infect Immun* 73: 3842–3850.
67. Coleman JJ, Muhammed M, Kasperkovitz PV, Vyas JM, Mylonakis E (2011) *Fusarium* pathogenesis investigated using *Galleria mellonella* as a heterologous host. *Fungal Biol* 115: 1279–1289.
68. Feldmesser M, Tucker S, Casadevall A (2001) Intracellular parasitism of macrophages by *Cryptococcus neoformans*. *Trends Microbiol* 9: 273–278.
69. García-Rodas R, Zaragoza O (2012) Catch me if you can: phagocytosis and killing avoidance by *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 64: 147–161.
70. Mesa-Arango AC, Forastiero A, Bernal-Martínez L, Cuenca-Estrella M, Mellado E, et al. (2012) The non-mammalian host *Galleria mellonella* can be used to study the virulence of the fungal pathogen *Candida tropicalis* and the efficacy of antifungal drugs during infection by this pathogenic yeast. *Med Mycol*.
71. Rowan R, Moran C, McCann M, Kavanagh K (2009) Use of *Galleria mellonella* larvae to evaluate the in vivo anti-fungal activity of [Ag2(mal)(phen)3]. *Biomaterials* 22: 461–467.
72. Bidla G, Hauling T, Dushay MS, Theopold U (2009) Activation of insect phenoloxidase after injury: endogenous versus foreign elicitors. *J Innate Immun* 1: 301–308.
73. Anaissie EJ, Karyotakis NC, Hachem R, Dignani MC, Rex JH, et al. (1994) Correlation between in vitro and in vivo activity of antifungal agents against *Candida* species. *J Infect Dis* 170: 384–389.
74. Coleman JJ, Ghosh S, Okoli I, Mylonakis E (2011) Antifungal activity of microbial secondary metabolites. *PLoS One* 6: e25321.
75. Desalermos A, Muhammed M, Glavis-Bloom J, Mylonakis E (2011) Using *C. elegans* for antimicrobial drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 6: 645–652.
76. Coleman JJ, Okoli I, Tegos GP, Holson EB, Wagner FF, et al. (2010) Characterization of plant-derived saponin natural products against *Candida albicans*. *ACS Chem Biol* 5: 321–332.
77. Drago M, Scaltrito MM, Morace G (2004) In vitro activity of voriconazole and other antifungal agents against clinical isolates of *Candida glabrata* and *Candida krusei*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 23: 619–624.
78. Muñoz P, Sánchez-Somolinos M, Alcalá L, Rodríguez-Creixems M, Peláez T, et al. (2005) *Candida krusei* fungemia: antifungal susceptibility and clinical presentation of an uncommon entity during 15 years in a single general hospital. *J Antimicrob Chemother* 55: 188–193.
79. Ostrosky-Zeichner L, Paetznick VL, Rodríguez J, Chen E, Sheehan DJ (2009) Activity of anidulafungin in a murine model of *Candida krusei* infection: evaluation of mortality and disease burden by quantitative tissue cultures and measurement of serum (1,3)-beta-D-glucan levels. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 1639–1641.
80. Muhammed M, Fuchs BB, Wu MP, Breger J, Coleman JJ, et al. (2012) The role of mycelium production and a MAPK-mediated immune response in the *C. elegans-Fusarium* model system. *Med Mycol* 50: 488–496.

Original article

Amphotericin B mediates killing in *Cryptococcus neoformans* through the induction of a strong oxidative burst

Fernanda Sangalli-Leite^{a,b,1}, Liliana Scorzoni^{a,b,1}, Ana Cecilia Mesa-Arango^{a,c}, Celia Casas^d, Enrique Herrero^d, Maria José Soares Mendes Gianinni^b, Juan Luis Rodríguez-Tudela^a, Manuel Cuenca-Estrella^a, Oscar Zaragoza^{a,*}

^a Mycology Reference Laboratory, National Centre for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Crta Majadahonda-Pozuelo Km 2, Majadahonda 28220, Madrid, Spain

^b Universidade Estadual Paulista – UNESP, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-SP, Laboratório de Micologia Clínica, Rua Expedicionários do Brasil, 1621, Centro, CEP: 14801-902, Araraquara-SP, Brazil

^c Grupo de Investigación Dermatológica, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

^d Department of Basic Medical Sciences, IRBLleida, Universitat de Lleida, Montserrat Roig 2, Lleida 25008, Spain

Received 22 November 2010; accepted 18 January 2011

Available online 21 February 2011

Abstract

We studied the effects of Amphotericin B (AmB) on *Cryptococcus neoformans* using different viability methods (CFUs enumeration, XTT assay and propidium iodide permeability). After 1 h of incubation, there were no viable colonies when the cells were exposed to AmB concentrations ≥ 1 mg/L. In the same conditions, the cells did not become permeable to propidium iodide, a phenomenon that was not observed until 3 h of incubation. When viability was measured in parallel using XTT assay, a result consistent with the CFUs was obtained, although we also observed a paradoxical effect in which at high AmB concentrations, a higher XTT reduction was measured than at intermediate AmB concentrations. This paradoxical effect was not observed after 3 h of incubation with AmB, and lack of XTT reduction was observed at AmB concentrations higher than 1 mg/L. When stained with dihydrofluorescein, AmB induced a strong intracellular oxidative burst. Consistent with oxidative damage, AmB induced protein carbonylation. Our results indicate that in *C. neoformans*, Amphotericin B causes intracellular damage mediated through the production of free radicals before damage on the cell membrane, measured by propidium iodide uptake.

© 2011 Institut Pasteur. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: *Cryptococcus neoformans*; Amphotericin B; Oxidative burst; XTT; Propidium iodide

1. Introduction

Amphotericin B (AmB) is the antifungal agent that has been most widely used in clinical practice since its discovery in 1955 [1]. It presents a potent activity against the majority of fungi, including yeast and filamentous moulds (see review in [2]), and only a few species, such as *Aspergillus terreus*, *Scedosporium prolificans* and *Trichosporon asahii*, show intrinsic resistance to this compound [2–4]. Classically, its

main action mechanism has been binding to ergosterol, which yields pores in the membrane, ion loss and cell death (see review in [5]). Although in the last years new antifungals have been included in clinical practice, such as azole derivatives and candins, AmB still remains as the first choice for the treatment of different invasive mycoses, such as zygomycosis and cryptococcal meningitis (see reviews in [6,7]). This last disease is caused by the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*, whose incidence has significantly emerged in the last decades, especially among HIV patients. Although in developed countries its incidence has decreased due to the introduction of the high active antiretroviral treatment (HAART), its early associated mortality has not changed [8,9]. Moreover, in developing countries, it has been estimated that

* Corresponding author.

E-mail address: ozaragoza@isci.es (O. Zaragoza).

¹ Both authors have equally contributed to the work and share the first authorship of the article.

this fungus causes more than 600,000 deaths per year [10]. The treatment for cryptococcal meningitis is based on an initial therapy of Amphotericin B followed by a maintenance treatment with fluconazole (see recent guidelines in [11] and review in [12]). Resistance to these compounds has been described among clinical strains [13] and for this reason, investigation of the role of Amphotericin B on *C. neoformans* has particular interest.

Although binding to ergosterol and pore formation is the most accepted mechanism of action for AmB (see review in [14]), several reports suggest that this antifungal has other effects on the cell. In particular, it has been suggested that AmB can be auto-oxidized with the subsequent production of free radicals [1,15,16]. In this work, we have measured the effect that AmB has on the viability of *C. neoformans* using different methods: XTT reduction assay, propidium iodide staining, and CFUs enumeration. In the XTT assay, a tetrazolium salt is added to the cells, and this compound is reduced to formazan by living cells [17,18]. This phenomenon occurs mainly through electron transfer at the mitochondrial level. In the case of propidium iodide staining, this compound is taken by the dead cells as a consequence of a disruption of the membrane integrity, which results in an increased permeability and fluorescence in dead cells once it binds to DNA, which is proportional to the DNA content of the cells [19]. Finally, the long-term effect of an antifungal on the ability of the cells to yield a viable colony (colony forming units, CFUs enumeration) is also widely used, and reflects the final outcome of the interaction between the compound and a cell.

Our results indicate that after AmB addition, the cells become metabolically inactive before they lose their membrane integrity. Moreover, AmB rapidly induces a strong oxidative burst in the cells, which suggests that AmB has other effects on *C. neoformans* different to binding to the cell membrane and killing induction through pore formation.

2. Material and methods

2.1. Yeast strains and growth conditions

C. neoformans H99 strain (serotype A, [20]) was the strain used in most of the experiments. In addition, 24067 (ATCC), B3501 [21] and other *C. neoformans* strains from the Yeast Collection of the Spanish National Mycology Reference Laboratory (CL-2132, CL7041, CL5801) were also used. The yeasts were routinely grown in Sabouraud liquid medium overnight at 30 °C with moderate shaking (150 rpm). Then, the cells were collected by centrifugation, and suspended in PBS. To induce melanization, cells from H99 strain were grown in L-Dopa medium (25 mM L-3,4-dihydroxyphenylalanine, 20 mg/mL thiamine-HCL, 29.4 mM KH₂PO₄, 10 mM MgSO₄·7H₂O, 13 mM Glycine, 15 mM D-Glucose) for 7 days at 30 °C with shaking. To obtain non-melanised control cells, the yeasts were grown in the same conditions without L-DOPA.

2.2. Amphotericin B-induced killing

Yeast cells were grown as described above and suspended in PBS buffer at 10⁷ cells/mL (2× stock). Then, Amphotericin B (Sigma–Aldrich Quimica, S. A. Madrid, Spain) was diluted to 2× stock aliquots, and equal volumes of cells and AmB were mixed. The final AmB concentrations ranged from 0.06 to 16 mg/L. The cells were incubated at 37 °C during different time periods (1, 3 or 24 h), and aliquots were plated in agar Sabouraud plates. The plates were incubated at 30 °C during 48 h, and the number of colonies was enumerated. The viability was expressed as percentage of colonies obtained in the samples treated with Amphotericin B compared to the untreated control.

2.3. XTT assay

Cells from H99 strain were grown in liquid Sabouraud at 30 °C for different time periods (24 or 48 h). Then, the cells were extensively washed with PBS, and counted using a haemocytometer. A suspension of 10⁷ cells/mL was prepared in PBS, and 100 µL of this suspension were added to each well of 96-well microdilution plates. Then, Amphotericin B aliquots were prepared as 2× stocks, and 100 µL were added to the wells. As a result, 10⁶/mL cells were exposed to AmB at different concentrations (from 0.06 to 16 mg/L) in a final volume of 200 µL. One hundred microliters of PBS were added to several wells as control of viable cells. In parallel, an aliquot of the original yeast cells suspension (10⁷ cells/mL) were heat-inactivated by incubating the cells at 60 °C during 45 min, and 100 µL of this suspension were also added to different wells (killed cells controls). The microdilution plate was incubated at 37 °C for different time periods (1 and 3 h), and then centrifuged at 3500 g. Then, the supernatant was removed, and XTT reduction by metabolically active cells was measured as described in [22]. Briefly, 100 µL of a solution containing 0.5 mg/mL of 2,3-Bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT, Sigma–Aldrich) and 25 µM menadione (Sigma–Aldrich, prepared from a 10 mM stock solution in absolute ethanol) in PBS were added to each well. Since XTT reduction by living cells is not an end-point reaction, the absorbance at 450 nm was monitored over time. The plate was incubated at 30 °C in an iEMS Reader MF spectrophotometer (LabSystems, Thermo Fisher Scientific) and the optical density at 450 nm was monitored every 30 min during 18 h. Viability was calculated from the absorbance values obtained after 4–6 h of incubation. The value of the average optical density of the heat-killed cells was subtracted from the optical density of the rest of the wells. Then, the viability percentage was calculated as the (O.D of the amphotericin treated wells/O.D. of the viable cells) × 100. All the experiments were repeated in different days, obtaining very similar results.

2.4. Propidium iodide staining

The cells were prepared and treated with Amphotericin B as described above (Amphotericin B-induced killing section),

and propidium iodide was added at 10 µg/mL. Then, the fluorescence intensity was measured by flow cytometry using a FACSCalibur cytometer (Becton Dickinson) and the CellQuest software in a Macintosh computer. The data was finally processed using the WinMDI 2.9 software (<http://facs.scripps.edu/software.html>). Heat-killed and viable cells (non-treated with amphotericin B) were also included. The percentage of dead cells in each sample was defined as the percentage of cells stained with propidium iodide compared to the total number of cells analyzed in that sample. For the analysis, no gate of the FSC/SSC plot was used, so all the cells were considered in our study.

2.5. Detection of free radicals by dihydrofluorescein diacetate (DHF) treatment

C. neoformans cells (5×10^6 /mL) were treated with different concentrations of hydrogen peroxide (H₂O₂) or AmB during 1 or 3 h. Then, DHF was added from a 100× stock solution to the cells to a final concentration of 40 µM. Intensity of fluorescein-formed fluorescence was measured in a FACSCalibur cytometer using the CellQuest software, and the data was finally processed using the WinMDI 2.9 software (<http://facs.scripps.edu/software.html>). For the analysis, no gate of the FSC/SSC plot was used, so all the cells were considered in our study.

2.6. DAPI staining and fluorescence microscopy

To observe the nuclei, the cells were treated with 2 µg/mL of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). After 2 min incubation at room temperature, the cells were washed with PBS and placed on a slide. Then, fluorescence was observed under a Leica DMI3000B. Pictures were taken with a Leica DFC300 digital camera using the LAS 3.3.1 software. Figure compositions were made using Adobe Photoshop 7.0 software.

2.7. Detection of protein carbonylation

Analysis of protein carbonylation after derivatization of carbonyl groups with dinitrophenylhydrazine (DNPH) was carried out as described in [23]. Blotted membranes were incubated with rabbit anti-DNPH antibodies (Sigma), at 1:2000 dilution. The experiment was repeated twice with different samples collected in different days, obtaining very similar results. Quantification of the intensity of the bands was performed using ImageJ software (National Institute of Health, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). A selection covering a representative area of the wells was selected, and a relative plot of the intensity of the protein of those wells was calculated using the software. This was done for both the intensity of the carbonylated proteins, as well as for the control gel stained with Coomassie. The area of the intensity of each well was calculated, and the relative intensity was estimated as the intensity of the well of the carbonylated protein divided by the intensity of the well of the Coomassie gel. Then, for each time point, the control well (without any treatment) was giving an

arbitrary value of 100, and the value for the treated samples was expressed as percentage respected to the value of this control well.

3. Results

3.1. Correlation between CFUs and propidium iodide uptake after AmB treatment

To study the effect of Amphotericin B on *C. neoformans*, we compared the fungicidal activity using three different methods: CFUs enumeration, XTT reduction by living cells and propidium iodide staining. While comparing and standardizing these protocols, we observed discrepancies in the viability calculated. When *C. neoformans* cells were exposed to AmB and aliquots were plated, there was clear decrease in the number of viable cells at concentrations above 0.25–0.5 mg/L and a total fungicidal effect at concentrations higher than 1 mg/L (Fig. 1). We also compared the mortality of *C. neoformans* cells in the presence of AmB by another classical viability method, which is the uptake of propidium iodide by dead cells. This dye allows the determination of the cell cycle state of the cells, being easy to observe the typical G1/G2 peaks (Fig. 2, heat-killed control). When we performed a killing assay with different AmB concentrations and observed the fluorescence of the cells after propidium iodide addition by flow cytometry, we observed big discrepancies with the results obtained by CFUs enumeration. While after 1 h of incubation with high AmB concentrations there was a significant degree of killing using the CFUs methods (more than 95% of death at concentrations above 0.5 mg/L), the cells were not permeable to propidium iodide in the same conditions (Fig. 2), and only after 3 h PI uptake was observed in 50–80% of the cells at AmB concentrations above 4 mg/L (Fig. 2). Interestingly, the fluorescence intensity signal of the cells treated with high AmB concentrations for 3 h was higher than the signal obtained with heat-killed cells. This finding suggests that AmB could have effects on the DNA conformation or structure, so this molecule would be able to bind higher

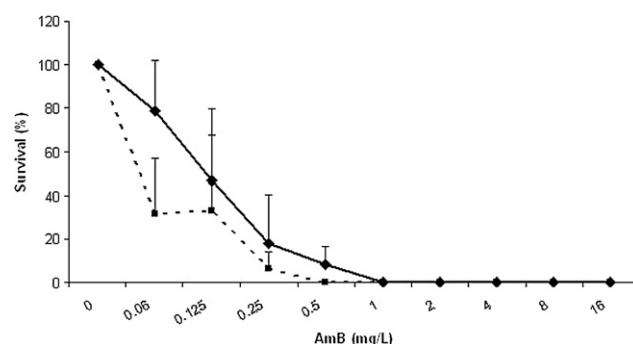


Fig. 1. Killing effect of AmB measured by CFUs enumeration. H99 strain was incubated with different AmB concentrations for 1 (solid line) or 3 h (dotted line). After the incubation, aliquots of the cell suspensions were plated on solid Sabouraud media for 48 h, and the number of CFUs was enumerated after 48 h. The graph represents the average and standard deviation of three different experiments.

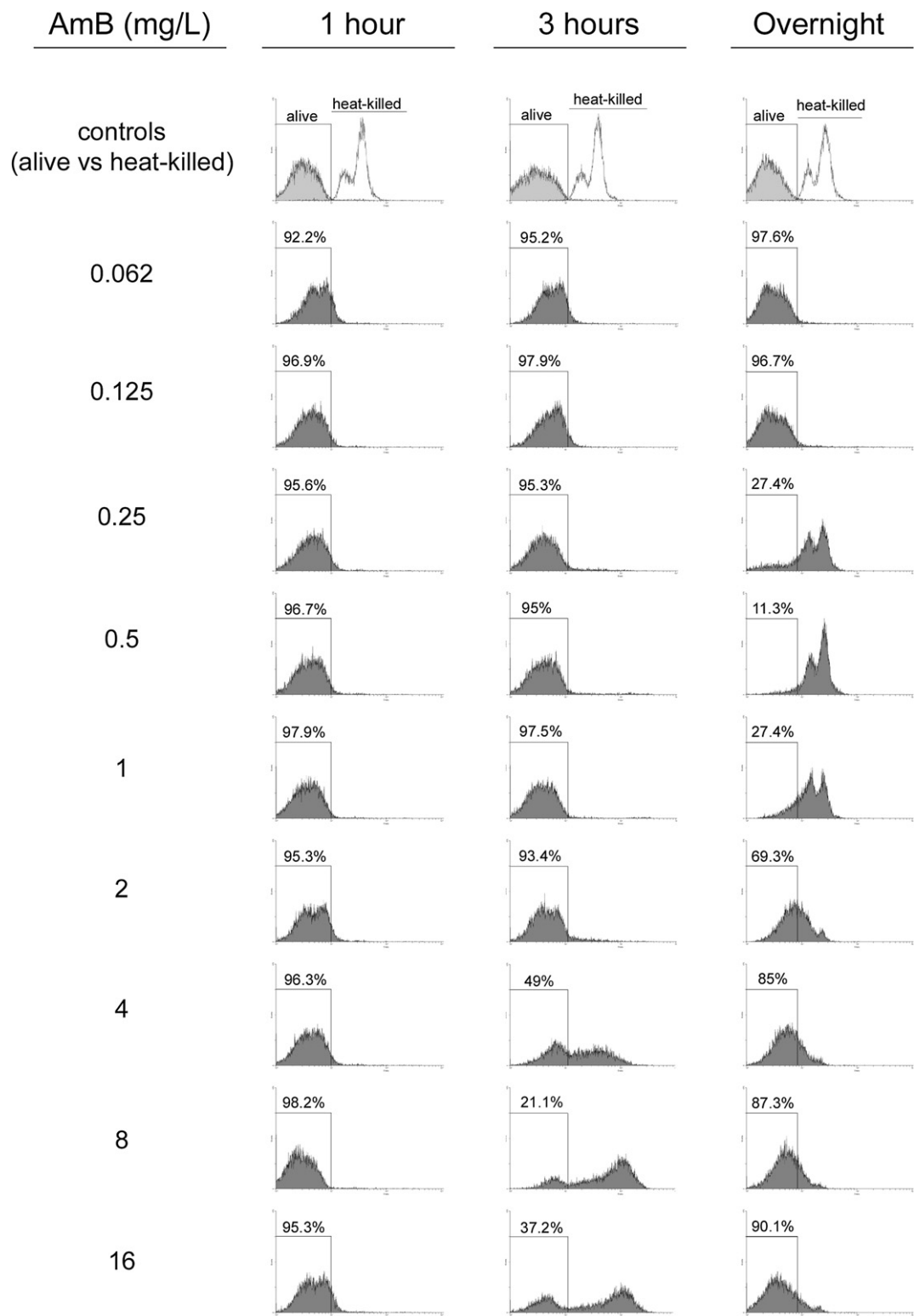


Fig. 2. Propidium iodide staining of Amphotericin B-treated cells. Cells from H99 strain were treated with different AmB concentrations for 1 or 3 h or overnight, and then propidium iodide was added as described in [Material and methods](#). The proportion of PI positive cells was determined by flow cytometry. Control samples of untreated (negative control) or heat-killed cells (positive control) were included. Using these controls, it was possible to establish the areas of PI-negative cells, which is presented in each plot.

amounts of PI on AmB-treated cells than on regular cells. Curiously, when the cells were incubated overnight with AmB, PI staining was observed only at intermediate concentrations, and cells incubated with the higher concentrations became negative for PI staining (Fig. 2). We argued that this lack of signal in those samples was not related to a lack of permeability of the cells, but rather to a lack of nucleus as a consequence of prolonged incubation in the presence of the antifungal. To test this possibility, we stained the cells with another nuclear dye, such as DAPI. When the cells were incubated overnight with 16 mg/L AmB, no clear staining with DAPI was observed. The cells presented a very diffuse fluorescence which rapidly quenched and disappeared, which was different from the signal elicited by control untreated cells, in which clear nuclei were observed. In contrast, when the cells were treated with a low AmB dose (0.12 mg/L), clear nuclei were observed (Supplemental Fig. 1). This data indicates that prolonged incubations with AmB yielded in the destruction of cellular compartments, such as the nuclei, and release of material to the extracellular space.

3.2. Effect of AmB on *C. neoformans* measured by XTT reduction assay

We also studied the effect of AmB on *C. neoformans* using the assay based on the reduction of XTT by living cells. In agreement with CFUs, a clear decrease in the reduction of XTT was observed at concentrations higher than 0.5 mg/L. However, we also found a paradoxical effect, in which there was not a linear correlation between the XTT reduction and AmB-induced killing observed by CFUs determination. When AmB concentration was gradually increased and reached concentrations between 2 and 16 mg/L, there was a partial increase in the amount of reduced XTT. We observed a high variation between different experiments with respect to the appearance of this paradoxical effect. So we argued that the initial metabolic state of the cells could have a profound influence on the pattern of XTT reduction. For this reason, we compared the effect of different concentration of AmB on the XTT reduction on cells obtained at different growth phases. To obtain these different growth phases, parallel liquid cultures were inoculated with different number of cells, so the next day they were collected at different growth phases. As predicted, we observed that this paradoxical effect correlated with the initial inoculum of the culture. The paradoxical effect was not observed when the culture was inoculated with 10^3 cells/mL. However, when the concentration of the initial inoculum increased, the paradoxical effect was prominent (Fig. 3A), being maximum when the culture was initially inoculated with 10^6 cells/mL. In another experiment, we inoculated a liquid culture with an initial inoculum of 10^3 cells/mL, and collected samples after 24 and 48 h, which correspond to logarithmic and stationary phase, respectively. In agreement with our previous findings, we observed that the paradoxical effect was absent at 24 h of growth, but obvious after 48 h (Fig. 3B). These results confirm that the paradoxical profile of XTT reduction was dependent on the growth phase of the culture. In

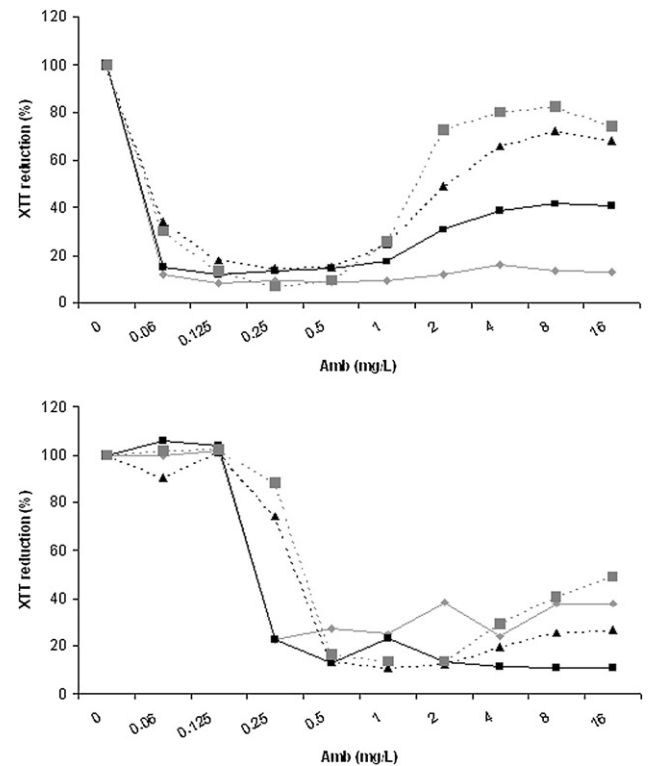


Fig. 3. XTT reduction of *C. neoformans* cells after treatment with different AmB concentrations. (A) *C. neoformans* cells were inoculated at initial concentrations of 10^3 (solid gray line, rhombus), 10^4 (solid black line, squares), 10^5 (black dotted line, triangles) and 10^6 (gray dotted line, squares) cells/mL. Then, the cultures were incubated at 30 °C overnight. Then, the four cultures were collected, washed with PBS, and suspended at 10^7 /mL. One hundred microliters of this suspension were placed in 96-well plates, and then AmB was added at different final concentrations, ranging 0.032–16 mg/L. Control wells without AmB were carried out in parallel. The plate was incubated at 30 °C for 1 h, then centrifuged and the medium removed. XTT reduction was measured as described in **Material and methods**. The percentage of XTT reduction in each well was calculated using the control without amphotericin as a reference value of 100% of XTT reduction. The experiment was performed in duplicate, obtaining from them almost identical results. The plot shows the average of the duplicates. In addition, the experiment was also repeated in different days obtaining very similar and consistent results. (B) A liquid culture was inoculated with cells from H99 strain at an initial cell density of 10^3 cells/mL. The culture was incubated for 24 (dotted lines) or 48 h (solid lines) at 30 °C. Then, the cells were exposed to different AmB concentrations for 1 h and XTT reduction was measured as described in **Material and methods** and in the section (A) of this figure legend. The experiment was performed in duplicate, both of them shown in the plot.

any case, we did not obtain viable colonies when the cells were treated with AmB concentrations above 1 mg/L, indicating another discrepancy between the viability measurement methods.

3.3. Detection of intracellular free radicals using DHF

We argued that the paradoxical effect observed in the reduction of XTT by *C. neoformans* cells after addition of high AmB concentrations might be related to a strong induction of metabolic activity in the cells. For this reason, we investigated if AmB produced an oxidative burst. For this purpose, we

treated the cells with dihydrofluorescein diacetate (DHF), which is cleaved into fluorescein by free radicals, producing a fluorescent signal. As shown in Fig. 4, when the cells were treated with AmB and then with DHF, there was a significant increase in the fluorescence of the cells, which was similar to the fluorescence obtained after treatment with H_2O_2 . Moreover, the production of free radicals was beginning to be observed at concentrations that are similar to the MIC value (0.25–0.5 mg/L), which suggests that the induction of free radicals participate in the inhibitory effect measured after AmB addition in the standard antifungal tests.

The production of free radicals was not observed when AmB and DHF were added to heat-killed cells, indicating that the effect was dependant on the metabolic activity of the cells and not to a direct effect of AmB on DHF (results not shown). In addition, no fluorescence was detected when the cells were treated with AmB or H_2O_2 without addition of DHF, confirming that fluorescence was due to an induction of free radicals production by AmB and not to auto-fluorescence. We observed these cells under the fluorescence microscope, and confirmed that AmB induced a strong cleavage of DHF in the cells (result not shown). In addition, we wanted to discard that a prolonged incubation in PBS could result in cellular changes that affected our results. For that purpose, we measured the oxidative burst produced in cells preincubated in PBS for 3 h. When we placed the cells in PBS for this time, and then added AmB, the production of free radicals was very similar to those conditions in which the cells were not preadapted (data not shown), suggesting that the incubation medium did not have a significant influence at the cellular level that could influence the production of free radicals. We also studied if AmB induced free radicals accumulation in media containing serum, to mimic the *in vivo* situation. When we added 10% of serum to the buffer, AmB induced the production of free radicals in a similar way than in the regular buffer, suggesting that the oxidative burst might be occurring also *in vivo*. To confirm that the phenomenon was not strain-specific, we studied the production of free radicals in 6 different strains after addition of AmB. All the strains produced free radicals when exposed to AmB (result not shown).

As stated above, we observed that XTT reduction had a paradoxical effect when the cells were treated with high AmB concentrations. We decided to investigate if this effect was related to a different effect of the production of free radicals. We inoculated different cultures with 10^3 and 10^6 /mL cells, and after 24 h, examined their susceptibility to AmB. These cultures exhibited different susceptibility to AmB, being the culture inoculated with 10^6 /mL slightly more resistant measured by CFUs determination (result not shown). We studied the effect of AmB different concentrations on the production of free radicals and on the uptake of PI. We chose a low (0.125 mg/L), intermediate (0.5 mg/L) and high (8 mg/L) concentration, based on the different susceptibility of the yeast shown at these concentrations. As shown in Fig. 5, there was also a paradoxical effect on the production of free radicals in these conditions. Low AmB concentrations induced a strong production of free radicals after 3 h of incubation in the culture inoculated with 10^3 cells/mL. In

contrast, when we exposed cultures to intermediate AmB concentrations, we observed a paradoxical effect after 1 h, since in this case production of free radicals was prominent in the culture inoculated with a high dose (10^6 /mL), but not with a low dose (10^3 /mL). This effect did not correlate with viability, measured by PI uptake (Fig. 5) or CFUs enumeration, but with the paradoxical effect observed with the XTT reduction assay. In any case, when a high AmB concentration was used (8 mg/L), a strong oxidative burst was observed.

3.4. Effect of AmB on protein carbonylation and cellular structure

Free radicals mediate damage in the cells through multiple mechanism, being one of them protein carbonylation [24]. We tested if AmB induced this protein modification by western blot. As shown in Fig. 6A and B, AmB induced protein carbonylation. When we performed a quantification of the amount of carbonylated proteins in each condition (Fig. 6C), we observed that after 1 h of incubation there was a slight increase in the amount of carbonylated proteins (around 1.5 fold increase), which was more noticeable after 3 h (over 2-fold increase). AmB-induced protein carbonylation was always lower compared to the samples treated with 5 m H_2O_2 , which was included as a positive control of the assay. After a longer incubation time (6 h), protein carbonylation decreased compared to the shorter times, most probably due to the high degree of killing and cellular damage shown by the cells at this time point. In addition to protein carbonylation, we observed that AmB addition resulted in the condensation of intracellular structures, an effect that has been associated with oxidative damage in the cells (Supplemental Fig. 2).

3.5. Effect of AmB in melanised cells

Accumulation of melanin at the cell wall level reduces the susceptibility of *C. neoformans* to AmB [31]. Since melanin has antioxidant properties, we decided to study if there was a correlation between the susceptibility of melanised cells to AmB and the production of free radicals. To induce melanin accumulation, we grew the cells in minimal medium supplemented with L-DOPA, and compared the production of free radicals and propidium iodide uptake with cells grown in the same conditions without L-DOPA. We consistently found that after AmB treatment, the proportion of cells in which AmB induced oxidative burst was lower in the melanised samples (around 7–9% difference), suggesting that the protective role of melanin might be related in part to its antioxidant role.

4. Discussion

Despite AmB has been successfully used in clinical practice during decades for the treatment of fungal infections, its action mechanism has not been completely elucidated. It has been shown that AmB binds to ergosterol at the cell membrane level, where it induces pore formation and loss of cellular integrity. However, there are numerous findings suggesting

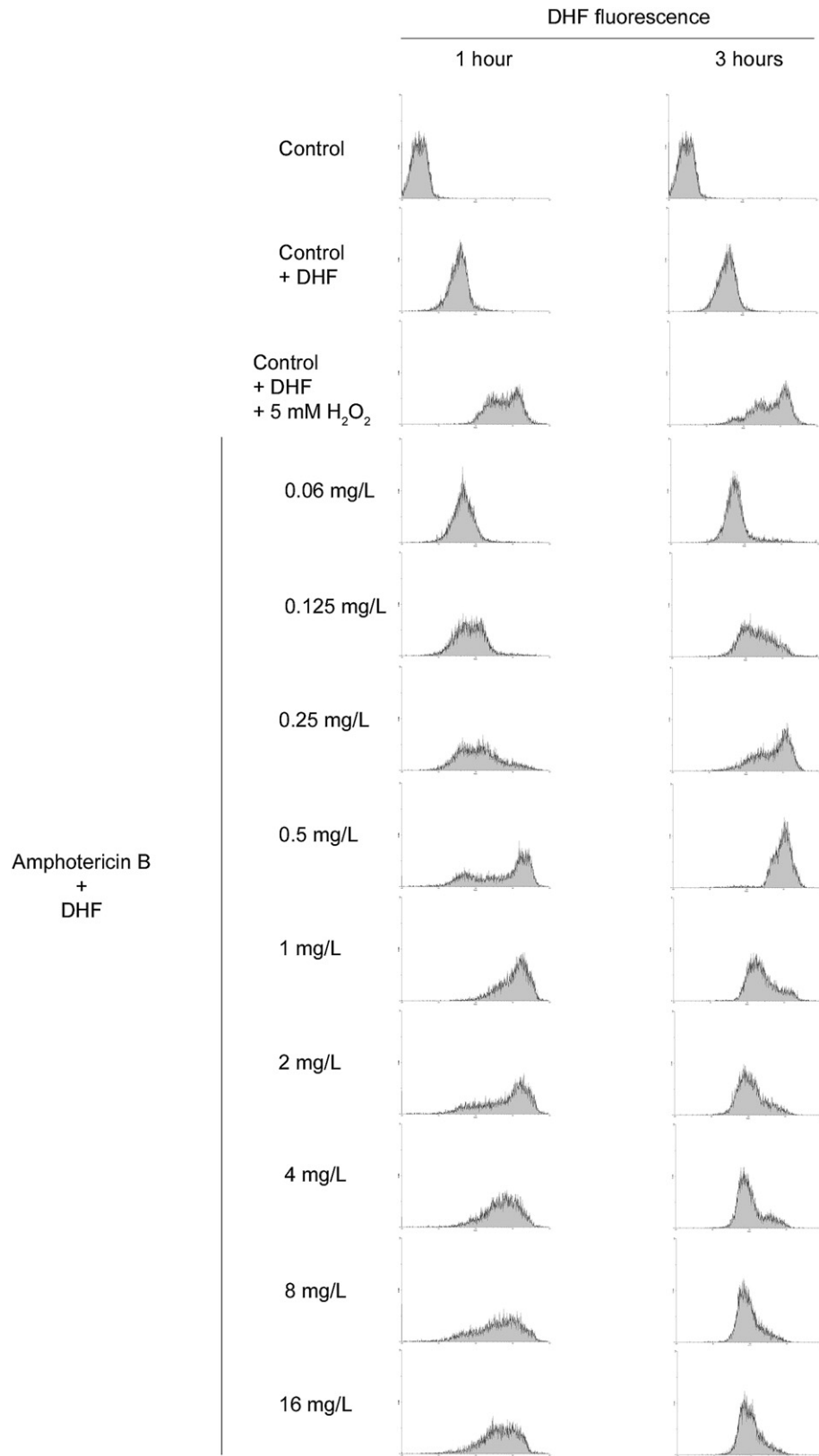


Fig. 4. Effect of AmB on the production of free radicals. *C. neoformans* cells were grown overnight and exposed to different AmB concentrations for 1 and 3 h as described in [Material and methods](#). As controls, the cells were exposed to 5 mM H₂O₂. Then, dihydrofluorescein diacetate (DHF) was added to the cells to measure the production of free radicals, and after 30 min incubation, the fluorescence intensity was measured by flow cytometry (FL1 channel). Control cells without DHF were carried out as auto-fluorescence controls. The plots show the histograms of the fluorescence intensity in each condition.

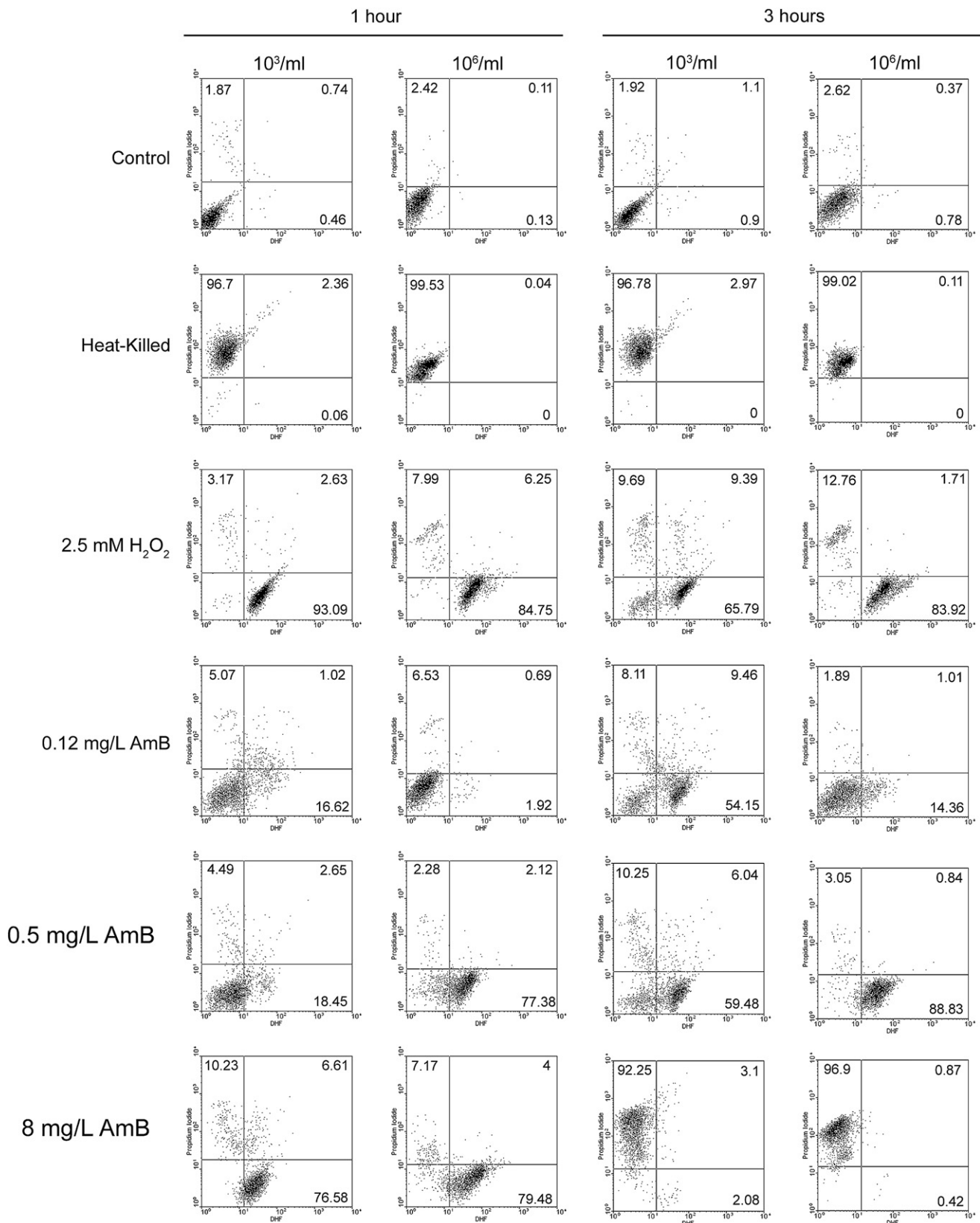


Fig. 5. Free radical production and propidium iodide uptake of cells inoculated at different initial concentrations and treated with different AmB concentrations. Liquid cultures were inoculated at initial cell densities of 10³ and 10⁶ cells/mL. Then, the cells were exposed to different AmB concentrations for 1 and 3 h, and DHF and propidium iodide were added as described in the [Material and methods](#). The fluorescence intensity produced by the DHF cleavage and PI uptake was recorded by flow cytometry. Heat-killed cells, or treated with 2.5 mM H₂O₂, or not exposed to any treatment were carried out in parallel as controls. These controls were also used to determine the quadrants of PI and/or DHF positive cells. The graphs show the dot plots of the fluorescence intensities (x-axis, DHF intensity, FL1 channel; y-axis, PI intensity, FL3 channel). The numbers indicate the percentage of cells present in each quadrant.

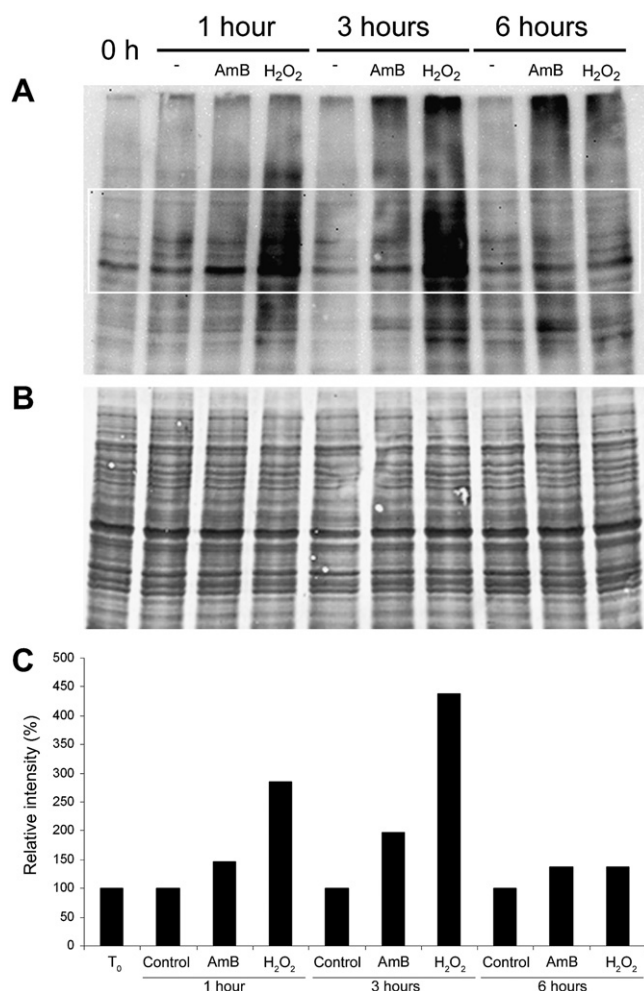


Fig. 6. Detection of protein carbonylation in the presence of AmB. Yeast cells from H99 strain were treated for 1, 3 and 6 h with AmB (1 mg/L) or H₂O₂ (5 mM). Parallel-untreated controls were carried out at each time point. The cells were washed with cold water, and protein extract and western blot were performed as described in [Material and methods](#). (A) Western blot of carbonylated proteins. The region highlighted with a square was the region used to quantify the intensity of the bands shown in panel C. (B) Coomassie staining of the gel (loading control). (C) Quantification of the intensities of the carbonylated proteins normalized by the intensity of the Coomassie gel.

that AmB has other effects on the cell. Early studies indicated that there was a dissociation between the AmB-induced cell death and ion loss, suggesting that pore formation was not the only mechanism involved in the damage produced by AmB in the cells [25]. Recent findings indicate that the ability to form ion channels is not required for the antifungal activity [26]. In *Candida albicans*, it has been shown that AmB induces an apoptosis-like phenotype, a phenomenon mediated through the production of reactive oxygen species (ROS) [27,28]. In agreement with this idea, it has been found that the intrinsic resistance to this antifungal in *A. terreus* is associated with high catalase activity [29], which is consistent with the idea that AmB mediates fungal killing through the induction of an oxidative burst in the cells. In addition, ascorbic acid, which can act both as an anti- or pro-oxidant molecule, enhance the antifungal effects of AmB without increasing the membrane permeability [30].

In this work, we have used several methods that measure different cellular parameters related to viability, and surprisingly, we found significant discrepancies between them. Previous works also indicated that CFU enumeration was not correlated with other viability measurements and that in certain conditions, cells treated with intermediate AmB concentrations could be resuscitated [31], which suggests that AmB has pleiotropic effects on the cells. Surprisingly, we found that the cells became metabolically inactive before losing their membrane integrity, suggesting that the primary effect of AmB on *C. neoformans* does not occur at the membrane level. Moreover, we observed that detection of XTT is not always associated with cell viability, as happened when the cells were treated with high AmB doses for short time periods. In these conditions, high AmB concentrations produced a higher XTT reduction compared to intermediate AmB concentrations, a phenomenon that we consider as paradoxical effect. This effect has been previously shown in the literature using different experimental conditions [31]. The reason for this effect is not clear. It is known that AmB can undergo auto-oxidation, and that this process results in the antifungal inactivation [15]. However, we do not believe that the paradoxical effect is produced by this inactivation, since it is not correlated with an increase in the ability of the cells to replicate and yield viable colonies on solid medium. Since XTT viability method is dependent on the reduction of this compound, and in turn, on the balance of electron transfer in the cells, we argued that this compound could transiently detect significant increases of the ROS production that would lead to cell death. We confirmed these results using dihydrofluorescein, a well-known detector for free radicals. The paradoxical effect of XTT was only observed when the cells reached a certain O.D., a finding which might be related to differences in metabolic activity of the cell. In agreement with this notion, it has been described that the activity of some antifungal compounds depends on the growth phase of the fungus [32].

There are several reports that have shown that AmB induces oxidative burst in the cell [27,28], but the role of this effect on the killing effect has not been determined. Although the oxidative effect of AmB had been previously described, we believe that our work describes important novelties that provide new insights on the AmB action mechanism. The use of multiple AmB concentrations, the study of the effects during time and the use of different viability methods has allowed us to provide the following findings: (1) the effects of AmB on the cell, oxidative burst and propidium iodide uptake, occur at different time points in the same samples. First, AmB induces a strong oxidative burst, and permeability to PI occurs later with time. This suggests that damage on the membrane is a late effect of AmB and that the initial action of AmB occurs intracellularly by inducing strong oxidative burst. Previous articles have shown that AmB had different effects on the cell, so that at intermediate concentrations it produced killing mediated through apoptosis (defined by the intracellular production of free radicals) and at high concentrations through necrosis (defined by the high permeability to propidium

iodide). This data, measured after 200 min [27], is in full agreement with our data in *C. neoformans*. However, in our work, the use of different time points has allowed us to obtain new insights about the effects of AmB. In particular, we have observed that at high concentrations, AmB also induces a strong oxidative burst at shorter time points (1 h). This data indicates that in *C. neoformans*, killing through apoptosis or necrosis are not independent phenomena, but they are observed at different time points. Based on our results, we propose that AmB has different effects on the cell which are measured at different time points. First, AmB would induce an initial and strong oxidative burst on the cells, through an unknown mechanism, and then, it would induce damage on the cell membrane. This later damage would be a consequence of the pore formation, but also by the damage produced by the oxidation of the lipids of the membrane induced by the presence of a high concentration of free radicals. The increase in the permeability of the membrane would occur when the cells are damaged and metabolically inactive by the production of free radicals, so in these conditions, the oxidative burst would not be observed anymore due to the lack of metabolic activity of the cell. For this reason, we prefer to avoid the terms apoptosis or necrosis for the action of AmB on *C. neoformans*, since they are observed in the same cells, but only at different time points, and we prefer to denominate the induction of free radicals as early damage produced by AmB, and the effects on the cell membrane and increased permeability as late damage. (2) AmB induces a paradoxical effect on the reduction of XTT which depends on the initial state of the cells. In this sense, we have observed that the induction of oxidative burst on the cells requires metabolically active cells. This suggests that AmB exerts action by inducing a metabolic pathway involved in electron transfer in the cell. In this sense, free radicals are natural products of multiple enzymatic reactions in the cell, such as the electron chain in the mitochondria. So differences in metabolic state of the cells, such as changes in mitochondrial activity or other enzymes involved in the electron balance in the cell could affect the effect of AmB, and in consequence, determine the appearance of this paradoxical effect. In addition, a striking finding is that AmB-treated cells elicited a stronger fluorescent signal after PI uptake, a finding that may be consistent with a higher DNA degradation by the free radicals productions and in turn, higher PI binding to the DNA. In this sense, previous findings demonstrate that AmB induces DNA condensation [27]. There are several possibilities that explain the effect of AmB on ROS production and on death. It is possible that after AmB addition, the cells detect the binding of the antifungal to the membrane and triggers a signal that produces an apoptotic-like phenotype, with mitochondrial damage and consequent ROS production, which yields later increased permeability and cell death. In this model, both ROS production and increased permeability would be the consequence of the same action mechanism. However, it is also possible that these two effects, ROS production and membrane permeability, are independent phenomena, and that AmB has in fact different targets in the cells. In this context, AmB has been shown to be an oxidizing molecule by itself [15,33,34], and this

effect has been related to its toxicity [35]. This could explain the production of an oxidative burst without initially affecting cellular permeability. In this second model, AmB would not have a unique target on the cell. However, even in this second model, the production of free radicals would produce damage on the membrane by lipid peroxidation, so both phenomena, oxidative burst and increased permeability, would finally also be related. In this sense, we have shown that AmB induces protein carbonylation, a modification induced by free radicals. However, this modification was more obvious in the presence of hydrogen peroxide, which suggests that AmB does not only exert its action through the induction of oxidative stress, but also supports the idea that AmB has in fact multiple effects on the cell, some of them mediated through damage on the membrane and some of them through oxidative burst induction. In this context, it has been reported in *C. neoformans* that killing in the presence of other factors, such as some bacteria and stress factors [27,36], is also mediated through the production of free radicals, which suggests that this killing mechanism could be widely distributed.

We believe that our results may have profound consequences in understanding the low clinical resistance observed to this antifungal. According to our findings, AmB elicits its effects on *C. neoformans* through different killing mechanisms. The fact that AmB has multiple effects on the cell indicates that the acquisition of resistance to this antifungal is a complex process that requires the accumulation of several mutations on the genome. We believe that these findings might be also important to understand the intrinsic resistance to AmB of some emergent fungal pathogens, such as *S. prolificans* or some *Mucorales* species, whose clinical management is complicated due to their particular antifungal susceptibility profile.

Acknowledgements

This work is funded by grant PCI2006-A7-0606 and SAF2008-03761 from the Spanish Ministry of Science and Innovation. A.C. Mesa-Arango is funded by the Carolina Foundation.

Appendix. Supplementary material

Supplementary material can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.micinf.2011.01.015](https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.01.015).

References

- [1] M. Oura, T.H. Sternberg, E.T. Wright, A new antifungal antibiotic, amphotericin B, *Antibiot. Annu.* 3 (1955) 566–573.
- [2] D. Ellis, Amphotericin B: spectrum and resistance, *J. Antimicrob. Chemother.* 49 (Suppl. 1) (2002) 7–10.
- [3] J.L. Rodriguez Tudela, T.M. Diaz-Guerra, E. Mellado, V. Cano, C. Tapia, A. Perkins, A. Gomez-Lopez, L. Rodero, M. Cuenca-Estrella, Susceptibility patterns and molecular identification of *Trichosporon* species, *Antimicrob. Agents Chemother.* 49 (2005) 4026–4034.
- [4] D.A. Sutton, S.E. Sanche, S.G. Revankar, A.W. Fothergill, M.G. Rinaldi, In vitro amphotericin B resistance in clinical isolates of *Aspergillus*

- terreus, with a head-to-head comparison to voriconazole, *J. Clin. Microbiol.* 37 (1999) 2343–2345.
- [5] M. Baginski, K. Sternal, J. Czub, E. Borowski, Molecular modelling of membrane activity of amphotericin B, a polyene macrolide antifungal antibiotic, *Acta Biochim. Pol.* 52 (2005) 655–658.
 - [6] M.T. Fera, E. La Camera, A. De Sarro, New triazoles and echinocandins: mode of action, in vitro activity and mechanisms of resistance, *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 7 (2009) 981–998.
 - [7] A.J. Sucher, E.B. Chahine, H.E. Balcer, Echinocandins: the newest class of antifungals, *Ann. Pharmacother.* 43 (2009) 1647–1657.
 - [8] F. Dromer, S. Mathoulin-Pelissier, O. Launay, O. Lortholary, Determinants of disease presentation and outcome during cryptococcosis: the CryptoA/D study, *PLoS Med.* 4 (2007) e21.
 - [9] O. Lortholary, G. Poizat, V. Zeller, S. Neuville, A. Boibieux, M. Alvarez, P. Dellamonica, F. Botterel, F. Dromer, G.H. Chene, T.F.C.S. Group, Long-term outcome of AIDS-associated cryptococcosis in the era of combination antiretroviral therapy, *AIDS* 20 (2006) 2183–2191.
 - [10] B.I. Park, K.A. Wannemuehler, B.J. Marston, N. Govender, P.G. Pappas, T.M. Chiller, Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS, *AIDS* 23 (2009) 525–530.
 - [11] J.R. Perfect, W.E. Dismukes, F. Dromer, D.L. Goldman, J.R. Graybill, R. J. Hamill, T. Harrison, R.A. Larsen, O. Lortholary, M.H. Nguyen, P.G. Pappas, W.G. Powderly, N. Singh, J.D. Sobel, T.C. Sorrell, Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America, *Clin. Infect. Dis.* 50 (2010) 291–322.
 - [12] A. Gomez-Lopez, O. Zaragoza, J.L. Rodriguez-Tudela, M. Cuenca-Estrella, Pharmacotherapy of yeast infections, *Expert Opin. Pharmacother.* 9 (2008) 2801–2816.
 - [13] J.A. Perkins, A. Gomez-Lopez, E. Mellado, J.L. Rodriguez Tudela, M. Cuenca-Estrella, Rates of antifungal resistance among Spanish clinical isolates neoformans var. neoformans, *J. Antimicrob. Chemother.* 56 (2005) 1144–1147.
 - [14] J. Bolard, How do the polyene macrolide antibiotics affect the cellular membrane properties? *Biochim. Biophys. Acta* 864 (1986) 257–304.
 - [15] M.T. Lamy-Freund, V.F. Ferreira, S. Schreier, Mechanism of inactivation of the polyene antibiotic amphotericin B. Evidence for radical formation in the process of autooxidation, *J. Antibiot (Tokyo)* 38 (1985) 753–757.
 - [16] M. Sokol-Anderson, J.E.J. Sligh, S. Elberg, J. Brajtburg, G.S. Kobayashi, G. Medoff, Role of cell defense against oxidative damage in the resistance of *Candida albicans* to the killing effect of amphotericin B, *Antimicrob. Agents Chemother.* 32 (1988) 702–705.
 - [17] N.W. Roehm, G.H. Rodgers, S.M. Hatfield, A.L. Glasebrook, An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT, *J. Immunol. Methods* 142 (1991) 257–265.
 - [18] D.A. Scudiero, R.H. Shoemaker, K.D. Paull, A. Monks, S. Tierney, T.H. Nofziger, M.J. Currens, D. Seniff, M.R. Boyd, Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines, *Cancer Res.* 48 (1988) 4827–4833.
 - [19] D.B. Jacobs, C. Pipho, Use of propidium iodide staining and flow cytometry to measure anti-mediated cytotoxicity: resolution of complement-sensitive and resistant target cells, *J. Immunol. Methods* 62 (1991) 101–108.
 - [20] J.R. Perfect, S.D.R. Lang, D.T. Durack, Chronic cryptococcal meningitis: a new experimental model in rabbits, *Am. J. Pathol.* 101 (1980) 177–194.
 - [21] K.J. Kwon-Chung, Morphogenesis of *Filobasidiella neoformans*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans*, *Mycologia* 68 (1976) 821–833.
 - [22] O. Zaragoza, C.J. Chrisman, M.V. Castelli, S. Frases, M. Cuenca-Estrella, J.L. Rodriguez-Tudela, A. Casadevall, Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival, *Cell Microbiol.* 10 (2008) 2043–2057.
 - [23] M.M. Molina, G. Belli, M.A. de la Torre, M.T. Rodriguez-Manzanique, E. Herrero, Nuclear monothiol glutaredoxins of *Saccharomyces cerevisiae* can function as mitochondrial glutaredoxins, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 51923–51930.
 - [24] E. Cabiscol, E. Piulats, P. Echave, E. Herrero, J. Ros, Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 27393–27398.
 - [25] W.C. Chen, D.L. Chou, D.S. Feingold, Dissociation between ion permeability and the lethal action of polyene antibiotics on *Candida albicans*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 13 (1978) 914–917.
 - [26] D.S. Palacios, T.M. Anderson, M.D. Burkner, A post-PKS oxidation of the amphotericin B skeleton predicted to be critical for the channel formation is not required for potent antifungal activity, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 13804–13805.
 - [27] A.J. Phillips, P. Sudbery, M. Ramsdale, Apoptosis induced by environmental stresses and amphotericin B in *Candida albicans*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 14327–14332.
 - [28] M. Sokol-Anderson, J. Brajtburg, G. Medoff, Amphotericin B-induced oxidative damage and killing of *Candida albicans*, *J. Infect. Dis.* 154 (1986) 76–83.
 - [29] G. Blum, S. Perkhof, H. Haas, M. Schrettl, R. Wurzner, M.P. Dierich, C. Lass-Flörl, Potential basis for Amphotericin B resistance in *Aspergillus terreus*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 52 (2008) 1553–1555.
 - [30] J. Brajtburg, S. Elberg, G.S. Kobayashi, G. Medoff, Effects of ascorbic acid on the antifungal action of amphotericin B, *J. Antimicrob. Chemother.* 24 (1989) 333–337.
 - [31] R.S. Liao, R.P. Rennie, J.A. Talbot, Sublethal injury and resuscitation of *Candida albicans* after amphotericin B treatment, *Antimicrob. Agents Chemother.* 47 (2003) 1200–1206.
 - [32] E. Mowat, S. Lang, C. Williams, E. McCulloch, B. Jone, G. Ramage, Phase-dependent antifungal activity against *Aspergillus fumigatus* developing multicellular filamentous biofilms, *J. Antimicrob. Chemother.* 62 (2008) 1281–1284.
 - [33] J. Barwicz, I. Gruda, P. Tancrede, A kinetic study of the oxidation effects of amphotericin B on human low-density lipoproteins, *FEBS Lett.* 465 (2000) 83–86.
 - [34] J. Brajtburg, W.G. Powderly, G.S. Kobayashi, G. Medoff, Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action, *Antimicrob. Agents Chemother.* 34 (1990) 183–188.
 - [35] J. Barwicz, I. Dumont, C. Ouellet, I. Gruda, Amphotericin B toxicity as related to the formation of oxidatively modified low-density lipoproteins, *Biospectroscopy* 4 (1998) 135–144.
 - [36] R. Ikeda, K. Sawamura, Bacterial and H₂O₂ stress-induced apoptosis-like events in *Cryptococcus neoformans*, *Res. Microbiol.* 159 (2008) 628–634.